



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

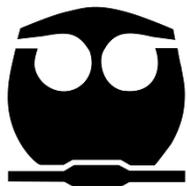
**BIODEGRADACIÓN DE BENZO[a]ANTRACENO  
POR MICROALGAS INMOVILIZADAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JORGE IGNACIO CASTRO GUDIÑO**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx.**

**AÑO 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** M. en C. FRANCISCO ROJO CALLEJAS  
**VOCAL:** DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO  
**SECRETARIO:** M. EN C. SILVIA CITLALLI GAMA GONZÁLEZ  
**1er. SUPLENTE:** Q.F.B. ADRIÁN DE SANTIAGO ZÁRATE  
**2° SUPLENTE:** Q.F.B. CAROLINA FLORES ÁVILA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 208 “ANÁLISIS DE TRAZAS” DEL EDIFICIO F2 PRIMER PISO Y ANEXO DEL LABORATORIO L3-D DEL EDIFICIO A TERCER PISO, AMBOS DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, CIRCUITO EXTERIOR S/N, COYOACÁN, CIUDAD UNIVERSITARIA, 04510, CD.MX.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO**

\_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. EN C. MARÍA DEL ROSARIO COVARRUBIAS HERRERA**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**JORGE IGNACIO CASTRO GUDIÑO**

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** (UNAM) y a la **Facultad de Química** (FQ) por las herramientas y los conocimientos brindados para mi formación académica y profesional así como la oportunidad de desarrollarme dentro de sus instalaciones y las experiencias vividas.

A la *Dirección General de Asuntos de Personal Académico* (DGAPA-UNAM) por el apoyo en el proyecto PAPIIT IT203214 y la beca otorgada para la realización de esta investigación.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) por apoyo en el proyecto de Ciencia Básica 166389.

Al *Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado* de la Facultad de Química, UNAM.

A la **Dra. Martha Patricia García Camacho** por aceptarme en su equipo de investigación, la oportunidad brindada para ejercerme como responsable del laboratorio, su asesoría, paciencia y comprensión durante el desarrollo y terminación de este trabajo impecable.

A la **M. en C. Rosario Covarrubias Herrera**, por su amabilidad, cariño, apoyo, comprensión, consejos, dedicación y tiempo brindado durante mi estancia en el laboratorio para culminar con la tesis.

A los *Profesores Académicos de la Facultad de Química* que forman parte de mi jurado, por tomarse el tiempo de atenderme, revisar este escrito y su valioso voto.

A *mis papás*, **Jorge Castro Pérez**<sup>†</sup> (Q.E.P.D.) y **Elvira Gudiño Romero**, quienes me dieron el don de la vida, su cariño, su amor, su tiempo, su esfuerzo y su valentía. Gracias a ustedes he aprendido a ser una persona capaz de enfrentar cualquier obstáculo pese a las condiciones en las que me encuentre. Valorar todo, lo que tengo, lo que he conseguido y lo que me rodea. Después de todas las adversidades por las que hemos atravesado como familia, también gracias a su esfuerzo, llegue a la meta. Los quiero mucho. *¡Estarán siempre en mí!*

A *mis hermanas* **Linda Lizbeth**, **Miriam Marisol** y **Karla Karina**, por su apoyo en pocas ocasiones, pero muy valiosas, en cada momento pude seguir aquí en la escuela.

A *mi novia* **Beatriz González Contreras** por esos momentos vividos mientras terminábamos la carrera y nuestras tesis, grandiosos recuerdos. *Gracias chaparrita por tu apoyo, cariño y amor.*

A la *familia* **González Contreras** por haberme recibido cálidamente, darme su confianza, su apoyo, las experiencias vividas, muchos lugares, muchas personas y un excelente trato desde que estaba en último semestre de la carrera. *¿Ubicación? —Aquí en el taller escribiendo esto.*

A todos mis *amigos-compañeros-camaradas-colegas* de la Facultad, CCHros, de la 205 y maestros con los que siempre me lleve bien, por los buenos y malos momentos, risas y corajes, en mi quedan momentos valiosos por los cuales los recordaré. *¡Ustedes saben bien quienes son, luego no anden diciendo que no los mencioné!*

Y finalmente a mis *compañeros del Laboratorio 208* con los que compartí un objetivo en común, el titularnos. Bien o mal, unos antes otros después, ya sabemos lo que es trabajarle. Buenos momentos de convivencia y risas. *Old school*: Fernando Hernández (Fer colombiano), Everardo Tapia (Ever), Mayra León, Enrique García (Kike), Eduardo Loera (lalo), Fernando Villeda (Joaquín). La *new school*; Andrés Baca, Ricardo, Jahziel Sánchez, Eduardo Castillo, Eduardo Becerril. *¡Espero encontrarnos en el futuro como profesionistas!*

¡MUCHAS GRACIAS!



DEDICACIÓN

Para mi familia, papás y hermanas.

*Mis sobrinos Víctor Armando, Héctor Eduardo y Andrea Julie Baeza Castro, sigan estudiando, ustedes pueden, superen a su tío.*

*Estoy para ayudarles!*



## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
I. OBJETIVO .....	3
1.1 General.....	3
1.1.1 Específicos .....	3
II. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	4
2.1.1 Definición .....	4
2.1.2 Clasificación.....	4
2.1.3 Propiedades fisicoquímicas.....	5
2.1.4 Fuentes de emisión y presencia en el medio ambiente .....	6
2.1.5 Toxicidad de los HAPs .....	7
2.2 Características del benzo[a]antraceno y sus metabolitos.....	9
2.3 Métodos analíticos para el análisis de HAPs y sus metabolitos .....	10
2.3.1 Extracción en fase sólida (EFS).....	12
2.3.2 Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) .....	14
2.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) .....	16
2.4.1 Diversidad cromatográfica .....	16
2.4.2 Instrumentación .....	17
2.4.2.1 Detectores .....	18
2.4.3 Definiciones de parámetros cromatográficos .....	19
2.5 Biodegradación y biorremediación .....	20
2.6 Generalidades de las microalgas .....	22
2.6.1 Generalidades de <i>Selenastrum capricornutum</i> .....	24
2.6.2 Generalidades de <i>Scenedesmus acutus</i> .....	24
2.7 Inmovilización de microalgas .....	25
III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....	27
3.1 Materiales y equipos .....	27
3.1.1 Disolventes .....	27
3.1.2 Estándares y reactivos de uso general .....	27
3.1.3 Cultivos.....	27
3.1.4 Reactivos para inmovilización .....	27
3.1.5 Microorganismos.....	27
3.1.6 Extracción de BaA y sus metabolitos .....	28
3.1.7 Sistema cromatográfico .....	28
3.1.8 Equipos e instrumentos.....	29

3.2 Preparación de las disoluciones estándar de BaA y dBaA (s)	29
3.3 EXPERIMENTACIÓN	30
3.3.1 Esquema general de la experimentación	30
3.3.2 Optimización de las condiciones de detección y separación	31
3.3.2.1 Selección de longitudes de onda óptimas para cada metabolito	31
3.3.2.2 Selección de la temperatura	31
3.3.2.3 Selección de fase estacionaria	31
3.3.2.4 Selección de la fase móvil para la separación	32
3.3.3 Manejo de los cultivos de microalgas	32
3.3.3.1 Crecimiento	32
3.3.3.1.1 Medio sólido	32
3.3.3.1.2 Medio líquido	33
3.3.3.2 Inmovilización de microalgas	34
3.3.3.3 Viabilidad de microalgas inmovilizadas y desinmovilización	35
3.3.4 Optimización de los métodos de extracción por EFS y DMFS	35
3.3.4.1 Acondicionamiento del adsorbente	36
3.3.4.2 Extracción en fase sólida	36
3.3.4.3 Dispersión de matriz en fase sólida	37
3.3.5 Validación del sistema cromatográfico	38
3.3.5.1 Linealidad del sistema	38
3.3.5.2 Precisión	38
3.3.5.3 Límites de cuantificación y detección	39
3.3.6 Validación de los métodos para los cultivos de microalgas inmovilizadas	39
3.3.6.1 Linealidad	39
3.3.6.2 Precisión	40
3.3.6.3 Límites de cuantificación y detección	40
3.3.6.4 Repetibilidad de los métodos de extracción con el parámetro % recobro	40
3.3.6.5 Prueba estadística entre microalgas	41
3.3.7 Aplicación de la metodología analítica	41
3.3.7.1 Bioensayos (ensayos de exposición del BaA a las microalgas)	41
3.3.7.2 Condición de análisis de metabolitos formados y BaA	42
IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS	43
4.1 Optimización de las condiciones de separación y detección	43
4.1.1 Selección de longitudes de onda óptimas para cada metabolito	43
4.1.2 Selección de la temperatura	44
4.1.3 Selección de fase estacionaria	45
4.1.4 Selección de la fase móvil para la separación	46

4.2 Inmovilización de microalgas .....	47
4.2.1 Viabilidad de microalgas inmovilizadas .....	47
4.3 Optimización de los métodos de extracción por, EFS y DMFS.....	48
4.4 Validación del sistema cromatográfico .....	51
4.5 Validación de la metodología para los cultivos de las microalgas inmovilizadas .....	52
4.5.1 Repetibilidad de la metodología de extracción con el parámetro % recobro.....	53
4.5.2 Prueba estadística entre especies de microalgas inmovilizadas. ....	54
4.6 Aplicación de la metodología analítica .....	55
4.6.1 Bioensayos .....	55
4.6.1.1 Monitoreo de los metabolitos .....	55
4.6.1.2 Monitoreo del BaA .....	63
4.6.1.3 Comparación con cultivos de algas libres .....	65
V.CONCLUSIONES .....	66
VI. REFERENCIAS .....	67
VII. ANEXOS.....	75
7.1 Valores de <i>t</i> de Student.....	75
7.2 Espectros de fluorescencia para dihidrodioles del BaA.....	75
7.3 Gráficos de la validación del sistema .....	76
7.4 Gráficos de la validación de la metodología .....	77
7.5 Gráficos de la validación de la metodología .....	79
7.6 ANOVA para la recuperación de la extracción entre microalgas .....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de propiedades fisicoquímicas del grupo de HAPs prioritarios.....	6
Tabla 2. Características fisicoquímicas del BaA y sus metabolitos.....	10
Tabla 3. Métodos analíticos para el análisis de dihidrodioles de HAPs (dHAPs). ....	11
Tabla 4. Adsorbentes empleados para EFS. ....	13
Tabla 5. Composición del medio Bristol-Proteosa Peptona. ....	33
Tabla 6. Concentraciones de metabolitos en las muestras empleadas para validación. ....	38
Tabla 7. Concentraciones de fortificación en muestra líquida y biomasa.....	40
Tabla 8. Concentraciones fortificadas para la repetibilidad de la metodología.....	40
Tabla 9. Tiempos de bioensayos para las microalgas inmovilizadas y libres.....	41
Tabla 10. Condiciones de análisis para extractos de bioensayos por HPLC.....	42
Tabla 11. Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaA en FD.....	43
Tabla 12. Porcentaje de recuperación de metabolitos empleando la EFS y DMFS. ....	49
Tabla 13. Porcentaje de recobro obtenido con metodología optimizada para metabolitos.....	50
Tabla 14. Características del análisis de metabolitos y BaA.....	50
Tabla 15. Resultados de validación del sistema cromatográfico para los dBaA.....	51
Tabla 16. Parámetros obtenidos de la linealidad del método.....	52
Tabla 17. Resultados de los parámetros para la validación de la metodología.....	53
Tabla 18. Porcentajes promedio de recuperación para microalgas libres. ....	53
Tabla 19. Porcentajes promedio de recuperación para microalgas inmovilizadas. ....	54
Tabla 20. Valores de $t$ para cada metabolito empleando microalgas inmovilizadas.....	54
Tabla 21. Linealidad del método de EFS y DMFS para cada uno de los metabolitos. ....	55
Tabla 22. Cantidades de metabolitos por microalgas inmovilizadas. ....	63
Tabla 23. Cantidades máximas de metabolitos para microalgas inmovilizada y libre.....	65
Tabla 24. Cantidades neta máximas para cada metabolito (medio líquido + biomasa).....	80
Tabla 25. Salida arrojada por Excel para el ANOVA.....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los 16 HAPs.....	9
Figura 2. Formatos utilizados en EFS: a) jeringa, b) cartucho y c) discos.....	13
Figura 3. Pasos en una extracción en fase sólida.....	14
Figura 4. Pasos en la dispersión de matriz en fase sólida .....	16
Figura 5. Esquema de los componentes de un HPLC .....	18
Figura 6. Degradación de HAPs .....	21
Figura 7. Niveles de organización de las microalgas .....	23
Figura 8. Fotografías de <i>Selenastrum capricornutum</i> y <i>Scenedesmus acutus</i> .....	25
Figura 9. Cromatógrafo de líquidos Lab Alliance Serie II. ....	28
Figura 10. Etapas desarrolladas en el proceso experimental.....	30
Figura 11. Preservación de cultivos microalgales en medio líquido y sólido. ....	33
Figura 12. Metodología para la inmovilización de las microalgas en alginato de calcio .....	34
Figura 13. Microalgas inmovilizadas en alginato de calcio.....	35
Figura 14. Metodología EFS para el medio líquido en contacto con las microalgas.....	36
Figura 15. Metodología de DMFS para la biomasa seca de microalgas libres o inmovilizadas. .	37
Figura 16. Optimización de las condiciones de detección.....	43
Figura 17. Cromatogramas del efecto de la temperatura.....	44
Figura 18. Cromatogramas con las diferentes fases estacionarias probadas. ....	45
Figura 19. Cromatogramas del efecto de la fase móvil en la retención de los metabolitos. ....	46
Figura 20. Gráfica de variación del logaritmo del factor de capacidad ( $\text{Log } k'$ ).....	47
Figura 21. Crecimiento de las microalgas después de haber permanecido inmovilizadas .....	48
Figura 22. Metodología por García Cicourel, 2015; para la extracción de los metabolitos. ....	49
Figura 23. Cromatogramas de medio líquido y biomasa para <i>S. capricornutum</i> .....	56
Figura 24. Cromatogramas de medio líquido y biomasa para <i>S. acutus</i> .....	57
Figura 25. Evolución de la concentración de metabolitos por <i>S. capicornutum</i> .....	60
Figura 26. Evolución de la concentración de metabolitos por <i>S. acutus</i> . ....	61
Figura 27. Gráficos de la cantidad neta (líquido más biomasa) de metabolitos. ....	62
Figura 28. Monitoreo cualitativo del BaA en función del tiempo de bioensayo .....	64
Figura 29. Valores de $t$ de Student .....	75
Figura 30. Barrido de emisión con el detector de fluorescencia para los metabolitos .....	75
Figura 31. Barrido de excitación con el detector de fluorescencia para los metabolitos.....	76
Figura 32. Graficas obtenidas para la validación del sistema. ....	76
Figura 33. Gráfico trazado para la determinación de LDT y LCT del sistema .....	77
Figura 34. Graficas obtenidas para la validación del método EFS.....	77

Figura 35. Graficas obtenidas para la validación del método DMFS.....	78
Figura 36. Gráfico trazado para la determinación de LDT y LCT de la metodología. ....	78
Figura 37. Gráficos de la linealidad del método de EFS y DMFS. ....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>% p/v</b>	Porcentaje peso-volumen
<b>% v/v</b>	Porcentaje volumen-volumen
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>µL</b>	Microlitros
<b>µm</b>	Micrómetros
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>BaA</b>	Benzo[a]antraceno
<b>C18</b>	Octadecilo
<b>C8</b>	Octilo
<b>d.p.</b>	Diámetro de partícula
<b>dBaA</b>	Dihidrodiol del benzo[a]antraceno
<b>DMFS</b>	Dispersión de matriz en fase sólida
<b>EFS</b>	Extracción en fase sólida
<b>FD</b>	Detector de fluorescencia
<b>h</b>	Horas
<b>HAPs</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución, por sus siglas en inglés
<b>k´</b>	Factor de capacidad
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>psi</b>	Libras por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>t<sub>0</sub></b>	Tiempo muerto cromatográfico
<b>t<sub>r</sub></b>	Tiempo de retención cromatográfico
<b>UV</b>	Detector ultravioleta
<b>UV-vis</b>	Espectro del ultravioleta al visible
<b>W</b>	Watts

## INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un amplio grupo de compuestos orgánicos caracterizados por tener en su estructura dos o más grupos bencénicos acoplados. Son un grupo conformado por alrededor de más de cien compuestos orgánicos diferentes, ampliamente distribuidos en el ambiente, muy persistentes y de importancia crítica debido a sus propiedades tóxicas, genotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas. Algunos de ellos son más tóxicos para la salud humana que otros debido a su alto grado de lipofilicidad y estabilidad (Ghosal et al., 2016). Hasta el momento la Agencia de Protección Ambiental de los EUA (USEPA, por sus siglas en inglés) ha enlistado 16 compuestos prioritarios de HAPs. Tres de ellos son clasificados por la Agencia Internacional para el Estudio del Cáncer (IACR por sus siglas en inglés, 2010) como compuestos para los cuales existe evidencia suficiente de que son cancerígenos para el ser humano. El benzo[a]antraceno, compuesto utilizado en este trabajo está incluido.

Los HAPs se encuentran de modo natural en combustibles fósiles y la causa más común de formación es principalmente por procesos de combustión incompleta de materiales orgánicos durante actividades humanas e industriales (Manariotis et al., 2011). Ejemplos de procesos naturales: incendios forestales, erupciones volcánicas, reacciones producidas por los seres vivos, filtraciones naturales del petróleo, reacciones geotérmicas asociadas a la producción de combustibles fósiles y minerales. Ejemplos de actividades humanas: derrames o descarga accidental del petróleo durante su transporte en aguas profundas, como la ocurrida al norte del Golfo de México en abril del 2010, el uso o eliminación de productos de petróleo en emisiones no controladas, combustión de carbón, gas, petróleo y madera, tabaco, humo de cigarro e incineración de desechos, la cocción de alimentos como pan tostado, carne a la parrilla, alimentos ahumados, etc.

La contaminación del suelo y agua por los HAPs ha venido en aumento como resultado de la explotación, refinación, distribución y almacenamiento de petróleo crudo y sus derivados. Hasta el año 2004, el volumen de derrames accidentales de petróleo y sus derivados fue calculado en 1.5 millones de toneladas por año, afectando suelo, agua y atmósfera. Uno de los grandes problemas que enfrentan las actividades de Petróleos Mexicanos (PEMEX) es la generación de residuos peligrosos, los cuales representan el 22% de las emisiones y descargas totales de esta industria (Ortiz-Salinas, et al., 2012). La tendencia de fugas y derrames en ductos de Petróleos Mexicanos al cierre de 2015 presentó un incremento del 31% en comparación con el año anterior.

Debido al vertimiento de sustancias tóxicas al medio ambiente, se han implementado soluciones que implican la remediación de los sitios contaminados; el uso de microorganismos como bacterias, hongos y algas, los cuales tienen la capacidad de atrapar y/o degradar estas

sustancias, algunas veces hasta su mineralización resulta ser muy ventajoso. Los procedimientos biológicos para limpiar suelo y agua contaminada (biorremediación) ha recibido especial atención, por ser de bajo costo y ambientalmente amigables, comparado con los procedimientos químicos y físicos. Sin embargo, la biorremediación puede llevar años para completar la restauración y recuperación de las áreas impactadas, dependiendo entre otros factores, de la cantidad de contaminante y de condiciones ambientales que favorezcan la proliferación y actividad de los organismos que se utilicen. Entre las problemáticas que genera el uso de microorganismos, se pueden citar el crecimiento sin control de éstos, la pérdida casi total de la biomasa, así como la susceptibilidad que pueden tener los microorganismos a factores ambientales y biológicos. Para minimizar el impacto de estos factores se ha impulsado el uso de estrategias, como la inmovilización, que presenta las ventajas de: concentrar en grandes cantidades la biomasa que puede ser utilizada como un subproducto; proveer a los microorganismos de una alta resistencia a compuestos tóxicos dentro de las aguas residuales tratadas; permitir inmovilizara más de un tipo de microorganismo y que es una técnica fácil de aplicar (De-Bashan & Bashan, 2010).

Por otra parte, es de aclararse que las rutas metabólicas empleadas para la degradación de HAPs no están completamente definidas, sobre todo en el caso de las microalgas. Por lo tanto, la determinación y supervisión de la degradación de HAPs y sus metabolitos durante la biorremediación nos da información necesaria para complementar el panorama de investigación que se tiene actualmente sobre sus características fisicoquímicas, su interacción con el ambiente, sus vías de degradación y su toxicidad. La determinación de HAPs se ha realizado comúnmente mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) y el tratamiento de las muestras mediante diversas técnicas de extracción con adsorbentes como la Extracción en Fase Sólida (EFS) y la Dispersión de Matriz en Fase sólida (DMFS). Sin embargo, el análisis de los metabolitos ha sido poco estudiado, debido a la falta de estándares, su dificultad de identificación y cuantificación ya que se forman en concentraciones muy bajas. Por lo tanto, la caracterización de sus productos de degradación ya sean de tipo dihydrodiol-HAP, oxi-HAPs, cetona-HAPs, quinonas o cumarinas, y determinar si son o no más tóxicos que el compuesto del cual se derivan es una tarea fundamental para elucidar las vías de degradación que conlleven a realizar más investigación, innovación y/o adaptación de tecnologías para la remediación de las áreas que han sido afectadas por este tipo de contaminantes llamados HAPs (Ghosal, et al., 2016).

En el presente trabajo se estudia la degradación del benzo[a]antraceno por dos especies de microalgas. Se optimizan y validan métodos de extracción y análisis cromatográficos para monitorear a tres metabolitos del tipo dihydrodiol del benzo[a]antraceno en medio líquido y biomasa de cultivos de microalgas que estuvieron inmovilizadas en cuentas de alginato.

## I. OBJETIVO

### 1.1 General

Evaluar la degradación de benzo[a]antraceno por las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus* inmovilizadas en alginato de calcio, cuantificando algunos de sus metabolitos de tipo dihidrodiol (dBaA) por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC/FD).

#### 1.1.1 Específicos

- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis y detección por fluorescencia de los metabolitos del benzo[a]antraceno.
- Optimizar las metodologías de extracción por EFS (medio líquido) y DMFS (biomasa) para los metabolitos del benzo[a]antraceno, en cultivos de microalgas que estuvieron inmovilizadas y expuestas al BaA.
- Validar los métodos de determinación EFS-HPLC-FD y DMFS-HPLC-FD para los BaA-metabolitos.
- Realizar la inmovilización de las microalgas con alginato de calcio.
- Aplicar los métodos analíticos para evaluar la capacidad degradativa de BaA por las microalgas inmovilizadas en cuentas de alginato por medio de ensayos de exposición en condiciones de luz, agitación y temperatura controladas, empleando diferentes tiempos de exposición.
- Realizar ensayos de exposición con microalgas libres para fines comparativos.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

#### 2.1.1 Definición

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), también conocidos como poliarenos o polinucleares son un amplio grupo de compuestos orgánicos, formados por átomos de carbono e hidrógeno caracterizados por contener en su estructura, dos o más anillos aromáticos fusionados en arreglos lineales, angulares o en racimo, por lo general contienen sólo átomos de carbono e hidrógeno, aunque átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno pueden sustituirse fácilmente en el anillo bencénico para formar compuestos aromáticos heterocíclicos (Ghosal et al., 2016; Wick & Haus, 2011; Gan et al., 2009).

En general, son un grupo conformado por alrededor de más de cien compuestos orgánicos diferentes, ampliamente distribuidos en el ambiente, muy persistentes y de importancia crítica debido a sus propiedades tóxicas, genotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas (Ghosal et al., 2016; Wick & Haus, 2011; Cerniglia, 1993).

#### 2.1.2 Clasificación

Los HAPs se clasifican según su origen en: biogénico, petrogénico y pirogénico. Los HAPs piogénicos son producto de procesos metabólicos de organismos, como naftaleno y perileno (Ortiz-Salinas et al., 2012; Wilcke et al., 2005). Los HAPs petrogénicos son derivados del petróleo, sus principales compuestos incluyen homólogos alquilados (con radicales) y no sustituidos, donde los homólogos alquilados son más abundantes que los no sustituidos. Generalmente ingresan al ambiente en fase gaseosa (por evaporación-deposición) y en fase líquida (derrames de crudo) principalmente (Ortiz-Salinas et al., 2012; Johnsen & Karlson, 2007). Los HAPs pirogénicos son producto de la combustión incompleta de todo material orgánico, incluyendo: hidrocarburos y carbón mineral. Se sabe que son la principal fuente de HAPs en el ambiente (Ortiz-Salinas et al., 2012; Thiele & Brummer, 2002). Aunque esta clasificación es simple, no siempre resulta útil para discernir las fuentes de HAPs ya que una vez expuestos sufren procesos de transformación que dependerán de las características químicas de los compuestos y de las variables ambientales en un sitio dado (Daly et al., 2007; Maliszewska et al., 2009).

También se clasifican como HAPs de bajo peso molecular si poseen dos o tres anillos aromáticos condensados, o HAPs de alto peso molecular cuando poseen cuatro o más anillos aromáticos. Los HAPs de bajo peso molecular son fácilmente degradados, más solubles en agua y más volatilizados que los de alto peso molecular, los cuales son más estables, muy poco

solubles en agua y tóxicos (Ghosal et al., 2016; Wick & Haus, 2011; Ortiz-Salinas et al., 2012; Plaza-Bolaños et al., 2010; Ali & Tarek, 2009). Por el contrario, los HAPs de alto peso molecular persisten en el ambiente debido a su baja volatilidad resistencia a la lixiviación y naturaleza recalcitrante (Wick & Haus, 2011).

Otra clasificación de estas moléculas orgánicas se basa en la composición estructural del HAP, si hay presencia de anillos de cuatro o cinco miembros. Si los HAPs solo contienen anillos benzoicos fusionados como máximo 8 anillos se consideran como alternantes, mientras que los HAPs no alternantes son aquellos que contienen anillos con menos de 6 miembros de átomos de carbono además de anillos de benceno, este grupo es extremadamente amplio en estructura y aumenta enormemente la diversidad de los HAPs (Wick & Haus, 2011).

### 2.1.3 Propiedades fisicoquímicas

En general, la estabilidad electroquímica, la persistencia, la resistencia hacia la biodegradación y el índice carcinogénico de los HAPs va con un aumento en el número de anillos aromáticos, la angularidad estructural, y la hidrofobicidad, mientras que la volatilidad, presión de vapor y solubilidad tienden a disminuir al aumentar el peso molecular (Ghosal et al., 2016; Rubio-Clemente et al., 2014; Wick et al., 2011). La mayoría de los subproductos de la degradación biológica y química de los HAPs tienden a ser más polares y poseer una solubilidad más alta en el ambiente que los mismos HAPs (Wick et al., 2011).

Los HAPs de bajo peso molecular tienden a estar más concentrados en la fase de vapor, mientras que los de mayor peso molecular se asocian a menudo en partículas (Herrera & Chávez, 2012).

En su forma química pura, los HAPs, generalmente existen como sólidos incoloros, blancos o amarillo-verde pálido, con un olor agradable débil a temperatura ambiente. Son compuestos orgánicos básicamente no polares, hidrofóbicos. Aunque la solubilidad de los HAPs puros en agua es baja, ésta depende de distintas variables como son la temperatura, el pH, la fuerza iónica, además de los constituyentes que pueda contener la matriz acuosa (Dabestani & Ivanov, 1999). Los HAPs son solubles en muchos disolventes orgánicos y son altamente lipofílicos. Su poder de bioacumulación se correlaciona con sus altos valores de  $K_{ow}$  el coeficiente de reparto octanol-agua, el cual indica la afinidad de un compuesto a una fase no acuosa, proporcionalmente a la masa. Son capaces de disolverse fácilmente en grasas y aceites, por lo general presentan una tendencia a almacenarse y acumularse en tejidos grasos en seres vivos (Wang & Wang, 2007; Vela et al., 2012). En la **Tabla 1** se concentran las propiedades fisicoquímicas de los HAPs prioritarios según la USEPA.

**Tabla 1.** Resumen de propiedades fisicoquímicas del grupo de HAPs prioritarios, obtenido de la base de datos ScFinder Scholar® y adaptado de Ghosal et al., 2016, en base a la USEPA 2014.

#	HAP	Peso molecular (g/mol)	F <sub>usión</sub> (°C)	T <sub>eb</sub> (°C)	P <sub>vapor</sub> (mmHg a 25 °C)	Solubilidad (mg/L)	Log K <sub>ow</sub>	Vida media (días)	Toxicidad
1	Acenafteno	154.2	95.0	96.2	4.5x10 <sup>-3</sup>	1.93	3.98	18.77	D
2	Acenaftileno	152.2	92.0	270	2.9x10 <sup>-2</sup>	3.93	4.07	30.70	D
3	Antraceno	178.2	218	342	1.7x10 <sup>-5</sup>	0.76	4.45	123.0	D
4	Benzo[a]antraceno	228.3	160	400	2.2x10 <sup>-8</sup>	1.0x10 <sup>-6</sup>	5.61	343.5	B2
5	Benzo[a]pireno	252.3	179	311	5.6x10 <sup>-9</sup>	4.9x10 <sup>-7</sup>	6.06	421.6	B2
6	Benzo[b]fluoranteno	252.3	168	481	5.0x10 <sup>-7</sup>	1.2x10 <sup>-5</sup>	6.04	284.7	B2
7	Benzo[g,h,i]perileno	276.3	273	550	1.0x10 <sup>-10</sup>	1.4x10 <sup>-7</sup>	6.50	517.1	D
8	Benzo[k]fluoranteno	252.3	216	480	9.6x10 <sup>-11</sup>	3.9x10 <sup>-5</sup>	6.06	284.7	B2
9	Criseno	228.3	256	448	6.3x10 <sup>-7</sup>	1.1x10 <sup>-6</sup>	5.56	343.8	B2
10	Dibenzo[a,h]antraceno	278.3	262	524	1.0x10 <sup>-10</sup>	7.3x10 <sup>-8</sup>	6.84	511.4	B2
11	Fenantreno	178.2	100	340	6.8x10 <sup>-4</sup>	1.20	4.45	14.97	D
12	Fluoranteno	202.3	110	375	5.0x10 <sup>-6</sup>	0.26	4.90	191.4	D
13	Fluoreno	166.2	117	295	3.2x10 <sup>-4</sup>	1.98	4.18	15.14	D
14	Indeno[1,2,3-cd]pireno	276.3	164	530	1.0x10 <sup>-6</sup>	6.9x10 <sup>-8</sup>	6.58	349.2	B2
15	Naftaleno	128.2	221	80.5	1.0	0.16	3.36	5.660	D
16	Pireno	202.3	156	404	2.5x10 <sup>-6</sup>	0.077	4.88	283.4	C

*B2 (posible carcinogénico para humanos con alguna evidencia epidemiológica), C (probable carcinógeno para humanos con evidencia de laboratorio suficiente), D (no clasificable en cuanto a carcinogenicidad humana).*

#### 2.1.4 Fuentes de emisión y presencia en el medio ambiente

La composición de éstos dependerá en su totalidad del tipo de combustible, la temperatura y el tiempo de residencia del compuesto a dicha temperatura (Herrera & Chávez, 2012; Ortiz-Salinas et al., 2012). A altas temperaturas (500-800°C) se crean HAPs simples y a temperaturas más bajas por un periodo prolongado (100-300°C) resultan HAPs más complejos (Wick & Haus, 2011; Haritash & Kaushik, 2009).

Los HAPs se encuentran de un modo natural en combustibles fósiles y la causa más común de formación es principalmente por pirólisis y procesos de combustión incompleta de materiales orgánicos durante actividades humanas e industriales (reacciones geotérmicas asociadas a la producción de combustibles fósiles y minerales, descarga accidental durante el transporte, el uso, o la eliminación de productos de petróleo o como resultado de las emisiones no controladas, combustión de carbón, gas, petróleo y madera; humo de cigarro e incineración de desechos; la cocción de alimentos como pan tostado, carne a las brasas, alimentos ahumados, etc.) producen fragmentos de moléculas y radicales que se combinan para dar lugar a la formación de los HAP. Además de los procesos naturales como incendios forestales, erupciones volcánicas, reacciones producidas por los seres vivos, filtraciones naturales de

petróleo (Ghosal et al., 2016; Herrera & Chávez, 2012; Manariotis et al., 2011; Haritash & Kaushik, 2009, Juhasz & Naidu, 2000).

Una vez formados los HAPs, dadas sus características de semi-volatilidad (en algunos casos), fácil deposición en partículas, y gran estabilidad química, sufren una gran dispersión en diferentes estratos medioambientales. La acumulación y persistencia de los HAPs en el medio ambiente puede producir efectos perjudiciales tanto en los ecosistemas acuáticos como en los terrestres (Cerniglia, 1993). Gracias a su relativa volatilidad y capacidad de adsorción a las partículas atmosféricas, los HAPs pueden encontrarse en el aire, en el suelo o en la superficie, en medios acuáticos, sedimentos de agua, agua subterránea adheridos a partículas de polvo, pudiendo ser depositados en lugares remotos a gran distancia de la fuente emisora, ampliando así la dimensión del problema, dispersándose de la atmósfera a la vegetación, en última instancia conduciendo a la bioacumulación en varias cadenas de comida (Ghosal et al., 2016; Gan et al., 2009; Thiele & Brummer, 2002; Menzie et al., 1992).

### **2.1.5 Toxicidad de los HAPs**

Los HAPs de bajo peso molecular (que contiene dos o tres anillos aromáticos) son agudamente tóxicos mientras que los de alto peso molecular (que contiene cuatro o más anillos) se consideran en gran parte como genotóxicos. Los efectos de los HAPs en la salud del ser humano dependen del tiempo de exposición, la cantidad o concentración a la que el individuo es expuesto, y la toxicidad innata de los compuestos. La exposición a mezclas contaminantes con altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos puede resultar en síntomas como irritación en ojos, náuseas, vómito, diarrea, y confusión. Sin embargo debido a que los HAPs son altamente liposolubles, se absorben fácilmente en el tracto gastrointestinal de mamíferos y se distribuyen rápidamente en una amplia variedad de tejidos con una marcada tendencia a la localización en la grasa corporal (Ghosal et al., 2016; Herrera & Chávez, 2012; Juhasz & Naidu, 2000).

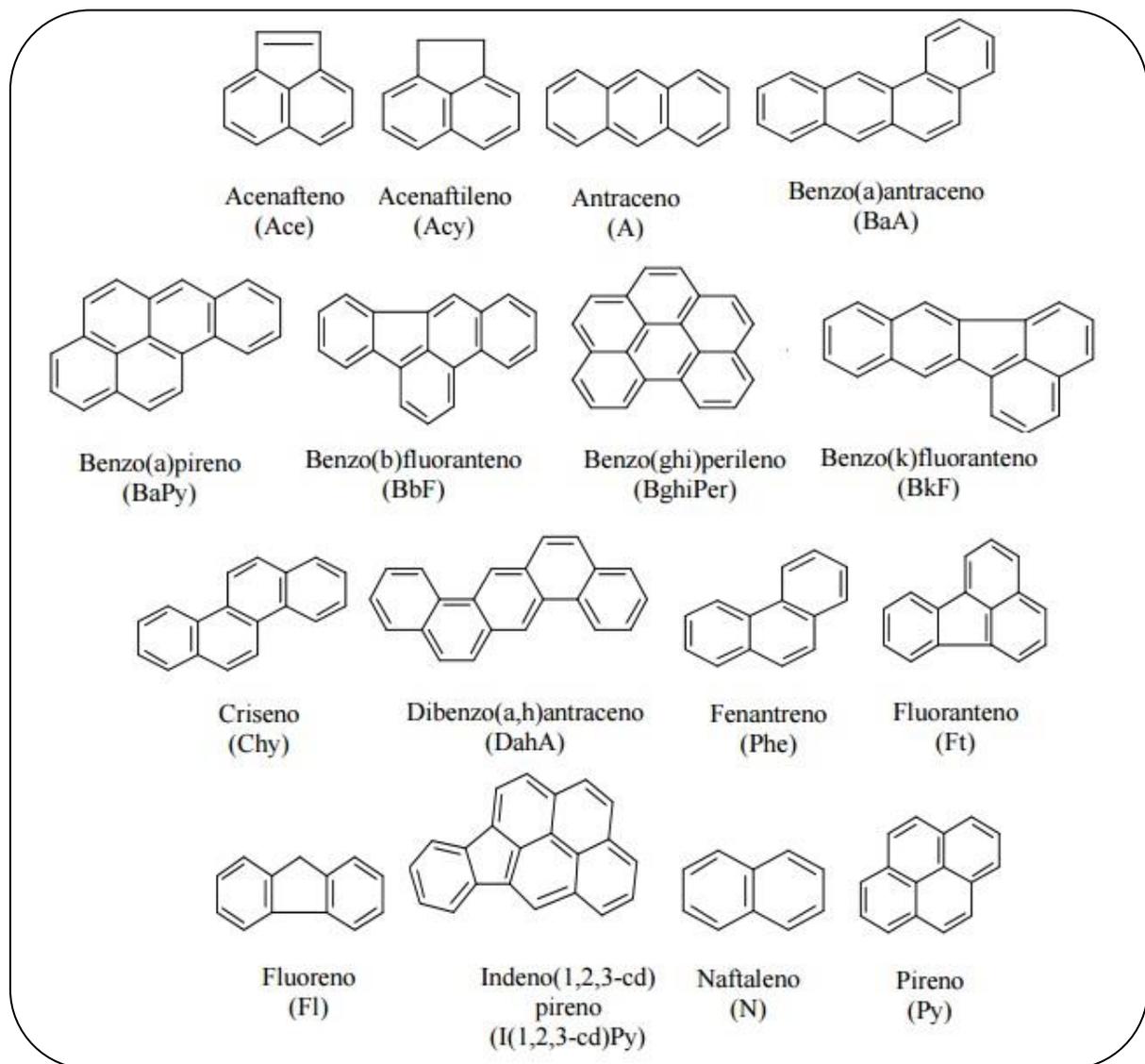
Los HAPs presentes en el ambiente no son activos biológicamente, los HAPs son activados previamente en el cuerpo, antes de funcionar como perturbadores endócrinos, cancerígenos o mutagénicos. La exposición prolongada a éstos es capaz de causar carcinogénesis después de ser metabolizados y transformados pueden producir cáncer de estómago, pulmón, cara, escroto, de vejiga y linfoma (Herrera & Chávez, 2012). La preocupación asociada con los HAPs aumenta aún más debido a su capacidad para interferir con la hormona de enzimas metabolizadoras de las glándulas tiroides, y sus efectos adversos en la reproducción, así como en el sistema inmunológico (Ghosal et al., 2016).

En las células de mamíferos, el mecanismo de activación es conocido y se ha encontrado que es similar para todos los HAPs. La primera fase de la transformación

metabólica implica reacciones de oxidación catalizadas por enzimas de la familia del citocromo P450 y la hidroxilación catalizada por la enzima epóxido hidrolasa. En la segunda fase ocurre una reacción de conjugación con el glutatión cuyo único objetivo es facilitar la excreción (Skupińska et al., 2004). Mientras que en los mamíferos la oxidación de HAPs se asocia a la actividad de las enzimas mono-oxigenasas de la familia del citocromo P450, en los microorganismos como bacterias y algas se relaciona con la actividad de dioxigenasas (Cerniglia, 1993; Juhasz & Naidu, 2000).

Los metabolitos reactivos de HAPs como los epóxidos y dihidrodioles presentan un riesgo para la salud debido a su potencial para unirse a las proteínas celulares y al ADN teniendo la capacidad de transformar células normales en malignas (Ghosal et al., 2016). La formación de aductos de ADN-HAP, es considerado un paso necesario en la carcinogénesis, ha sido ampliamente estudiado en modelos experimentales y se ha documentado en los tejidos humanos (Rapp, 2014; Pratt et al., 2011; Menzie et al., 1992).

De toda la abundancia que hay de los hidrocarburos poliaromáticos y su toxicidad, la USEPA ha dado de alta un listado con 16 compuestos de HAPs como contaminantes prioritarios del medio ambiente, creada en virtud de la ley de aguas limpias. Los contaminantes se eligen para esta lista debido al potencial de toxicidad y frecuencia de ocurrencia (Ghosal et al., 2016; Rapp, 2014; Rogers et al., 2002; Wick et al., 2011). Las características de estos 16 HAPs se presentan en la **Tabla 1** y su estructura química en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Estructuras químicas de los 16 HAPs prioritarios según la USEPA. Adaptado de Rapp, 2014.

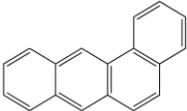
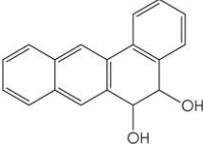
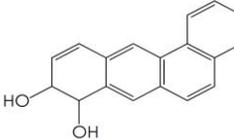
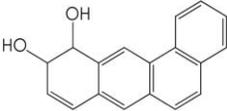
## 2.2 Características del benzo[a]antraceno y sus metabolitos

El benzo[a]antraceno está catalogado por la *IARC*, ente de la OMS en la categoría IIA que agrupa a las sustancias que poseen probada acción cancerígena en humanos, aunque su potencia tóxica es menor a la del benzo[a]pireno. Los estudios realizados indican que este compuesto es el hidrocarburo policíclico que se encuentra en mayor porcentaje que los demás. La exposición crónica a este compuesto condiciona la formación de tumores a nivel pulmonar, dérmico y renal en animales, almacenándose principalmente en el tejido lipídico. La exposición pública a este compuesto generalmente se da mediante contacto dérmico e inhalación de las emisiones industriales y vehiculares. Se almacena con facilidad en los alimentos ricos en grasas, así como también en el agua (Menzie et al., 1992).

El benzo[a]antraceno se presenta como escamas incoloras (esta característica depende del solvente eluyente), es soluble en etanol, tolueno, acetona, benceno, y éter etílico, poco

soluble en agua. Presenta una fluorescencia verde amarillenta, ya sea en solución o en su forma cristalina (Rodríguez et al., 2002). Se produce por condensación de cuatro anillos de benceno durante los procesos de combustión incompleta. En la **Tabla 2** se presenta la información disponible de las características del BaA y sus metabolitos dihidrodioles.

**Tabla 2.** Características fisicoquímicas del BaA y sus metabolitos.

<b>Estructura</b>				
<b>Nombre</b>	Benzo[a]antraceno	5,6-dihidrodiolBaA	8,9-dihidrodiolBaA	10,11-dihidrodiolBaA
<b>Fórmula condensada</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
<b>Fórmula SMILES</b>	<chem>c12c(c3c(cc4c(ccc4)c3)cc1)cccc2</chem>	<chem>c42c3c(C(O)C(O)c4cc1c(ccc1)c2)cccc3</chem>	<chem>c12c(c3c(cc4c(C=CC(O)C4O)c3)cc1)cccc2</chem>	<chem>c12c(c3c(cc4c(C(O)C(O)C=C4)c3)cc1)cccc2</chem>
<b>Masa molar (g/mol)</b>	228.30	262.31	262.31	262.31
<b>Punto de fusión (°C)</b>	135.96	178.26	178.04	178.04
<b>Punto de ebullición (°C)</b>	399.19	455.78	455.30	455.30
<b>Presión de vapor (mmHg, 25°C)</b>	2.72x10 <sup>-7</sup>	3.78x10 <sup>-11</sup>	3.94x10 <sup>-11</sup>	3.94x10 <sup>-11</sup>
<b>Solubilidad en agua (mg/L)</b>	0.02907	2.654.075	1.866	1.866
<b>LogK<sub>ow</sub></b>	5.76	3.25	3.42	3.42
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1.2	–	–	–

Todos los valores son obtenidos con el software USEPA [2017]. Programas de Estimación Interface EPI-Suite™ para Microsoft® Windows, v4.11. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, Washington, DC, USA. <https://goo.gl/P6N2lh>

### 2.3 Métodos analíticos para el análisis de HAPs y sus metabolitos

El análisis de HAPs en microorganismos es difícil debido a la baja concentración de los compuestos individuales en la que se encuentran en este tipo de matrices (ng/g) ya que generalmente la cantidad de materia disponible (algunos gramos) es limitada. El pretratamiento de la muestra antes del análisis cromatográfico es largo, en algunos casos el tiempo de extracción de HAPs dura hasta 56 h. Por lo que se requieren procesos de purificación y preconcentración más eficientes, confiables y rápidos (Domínguez Gutiérrez, 2008; Peña et al., 2003).

En la actualidad hay muchos métodos analíticos excelentes para la extracción y determinación de HAPs en muestras acuosas y sólidas, disponibles en la literatura. Los análisis generalmente se realizan por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector UV-DAD, fluorescencia o con ambos detectores en serie. Las etapas de separación y detección de HAPs se describen ampliamente por el método 525 de la USEPA, que es para la determinación de compuestos orgánicos en agua potable mediante CG y en el método 550, para HAPs en agua potable mediante HPLC (Busetti et al., 2006; Peña et al., 2003; Días et al., 2001).

Diversos metabolitos de los HAPs también han sido analizados. En la **Tabla 3** se muestran los métodos que se han reportado particularmente para dihidrodioles. En esta se incluyen los trabajos realizados en el grupo de laboratorio, para el aislamiento de los metabolitos se usó la metodología de extracción por EFS y DMFS que a continuación se describen en los apartados 2.3.1 y 2.3.2.

**Tabla 3.** Métodos analíticos para el análisis de dihidrodioles de HAPs (dHAPs).

#	Autor	Muestra	HAPs	Metabolitos	Extracción	Fase estacionaria	Fase móvil	Análisis
1	Alfarhani, et al. (2016)	Orina humana	BaP	8,9-dBaP	Membrana SPE	C18	-	Fluorescencia (RTF)
2	Agrawal & Shahi (2017)	Cultivo del hongo <i>Coriolopsis byrsina</i>	Py	Pireno- <i>trans</i> -4,5-dihidrodiol	L-L	DB-5ms capilar	-	CG-MS
3	Cerniglia, et al. (1994)	Cultivo fúngico <i>Cunninghamella elegans</i>	BaA	<i>trans</i> -3,4-dBaA, <i>trans</i> -8,9-dBaA, <i>trans</i> -10,11-dBaA	L-L	μBondapack C18 μPorasil silica	Gradiente ACN:H <sub>2</sub> O	TLC HPLC-UV-MS
4	García de Llasera, et al. (2016)	Cultivo de microalga <i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus acutus</i>	BaP	4,5-dBaP, 7,8-dBaP, 9,10-dBaP	SPE, MSPD	Nucleosil C18	Isocrática MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-FD-MS
5	García de Llasera & García-Cicourel (2017)	Cultivo de microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	BaA	5,6-dBaA, 8,9-dBaA, 10,11-dBaA	SPE, MSPD, on-line SPE	Nucleosil C18	Gradiente MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-UV-DAD
6	Gibson, et al. (1975)	Cultivo bacteriano de <i>Beijerinckia sp</i>	BaA	<i>cis</i> -1,2-dBaA, <i>cis</i> -8,9-dBaA, <i>cis</i> -10,11-dBaA, <i>cis</i> -5,6-dBaA	L-L	Permaphase ODS C18	Isocrática MeOH:H <sub>2</sub> O	TLC HPLC-UV-MS
7	Hernández Blanco & García de Llasera (2016)	Cultivo de microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	BaP, BaA, BbF, BkF	4,5-dBaP, 7,8-dBaP, 9,10-dBaP, 5,6-dBaA, 8,9-dBaA, 10,11-dBaA, 1,2-dBbF, 9,10-dBbF, 11,12-dBbF, 8,9-BkF	SPE, MSPD	Hichrom Spherisorb ODS C18, Hypersil Green PAH	Gradiente MeOH:H <sub>2</sub> O Isocrática MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-FD, HPLC-UV
8	Jin, et al. (2015)	Cultivo bacteriano de <i>Rhodococcus sp</i>	Py	<i>cis</i> -4,5-BaP	L-L	Columna Rtx-5MS	-	CG-MS
9	Jonsson, et al. (2004)	Bilis de pescado	Chy	Criseno- <i>trans</i> -1,2-dihidrodiol Criseno- <i>trans</i> -3,4-dihidrodiol	L-L	Grace Vydac C18, Agilent CP-Sil 8 CB	Isocrática ACN con acetate de amonio, gas helio	HPLC-FD, CG-MS

**Tabla 3.** Continuación. Métodos analíticos para el análisis de dihidrodioles de HAPs.

10	Liu, et al. (2014)	Almeja <i>Ruditapes philippinarum</i>	BaP	7,8-dBaP	L-L	Zorbax Eclipse PAH	Gradiente MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-FD
11	Olmos-Espejel, et al. (2012)	Cultivo de microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	BaP	4,5-dBaP, 9,10-dBaP	On-SPE, Off-SPE, MSPD	Hichrom Spherisorb ODS C18	Isocrática MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-FD
12	Pampanin, et al. (2016)	Bilis de bacalo	N, Phe	Dihidrofenantreno-1,2-diol Dihidronaftaleno-1,2-diol	-	-	-	HPLC-FD
13	Schoeny, et al. (1988)	Cultivo de microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	BaP	9,10-dBaP, <i>cis</i> -4,5-dBaP, <i>cis</i> -7,8-dBaP, <i>cis</i> -11,12-dBaP	L-L	-	-	HPLC-LSC
14	Sette, et al. (2013)	Orina de cangrejo	Phe	Diolfenantreno	SPE	Grace Vydac C18	Gradiente MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-MS
15	Sutherland, et al. (1992)	Cultivos fúngicos de <i>Rhizoctonia solani</i>	Ace	Antraceno- <i>trans</i> -1,2-dihidrodiol	L-L	Zorbax ODS C18	Isocrática MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-UV
16	Umar, et al. (2017)	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Py	<i>cis</i> -4,5-dBaP	L-L	TraceGOLD TG-5MS	Gas helio	CG-MS
17	Warshawsky, et al. (1988)	Cultivo de microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	BaP	4,5-dBaP, 7,8-dBaP, 9,10-dBaP, 11,12-dBaP	L-L	ODS-C18	-	HPLC-UV-MS
18	Warshawsky, et al. (1995)	Cultivo con variedad de microalgas	BaP	4,5-dBaP, 7,8-dBaP, 9,10-dBaP, 11,12-dBaP	L-L	ODS-C18	Gradiente MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-FD
19	Warshawsky, et al. (2007)	Cultivo bacteriano de <i>Mycobacterium sp</i> y cultivo de microalga <i>Selenastrum capricornutum</i>	BaP	4,5-dBaP, 9,10-dBaP, 11,12-dBaP	L-L	Resolve C18	Gradiente MeOH:H <sub>2</sub> O	HPLC-UV

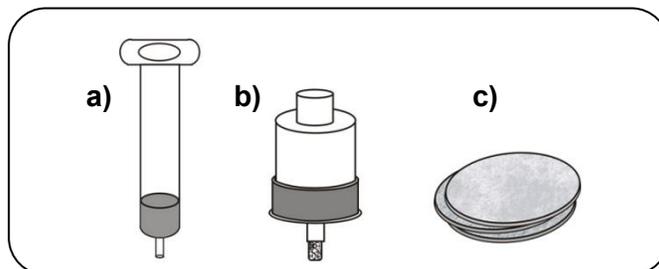
### 2.3.1 Extracción en fase sólida (EFS)

La EFS se basa en el reparto de los compuestos entre una fase líquida (muestra) y una fase sólida (adsorbente). Fue desarrollada a mediados de los años 70 como alternativa a la extracción líquido-líquido, siendo así una técnica aceptada por la USEPA para la preparación de muestras de agua potable y agua residual para el análisis de contaminantes orgánicos (Camel, 2003). Es una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizadas para matrices líquidas e incluso gaseosas antes de su análisis por técnicas instrumentales como cromatografía de líquidos o gases. Mediante la EFS se consigue la extracción del analito, la eliminación de interferencias y su concentración (Canosa Rodríguez, 2008; Marcé & Borrull, 2000).

En metodologías basadas en esta técnica, la muestra líquida se aplica a un cartucho o pre-columna empacada con un adsorbente capaz de fijar los compuestos de interés. La recuperación de los analitos se lleva a cabo por la adición de un volumen pequeño de disolvente de elución fuerte ya sea disolvente orgánico o en mezcla con agua, la fracción se colecta y puede inyectarse directamente o puede evaporarse a sequedad para reconstituirse en un disolvente adecuado para su análisis (Simpson, 2000).

Los compuestos a ser extraídos deben tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra líquida. La retención puede involucrar fuerzas polares, no-polares o de intercambio iónico (Hennion, 1999). Las fases estacionarias empleadas en la EFS son similares

a las utilizadas en cromatografía de líquidos y pueden estar contenidas en tres posibles formatos como se muestra en la **Figura 2**. De acuerdo con el carácter químico del grupo funcional unido a la sílice o al copolímero, las fases resultantes se pueden clasificar en: no polares, polares o de intercambio iónico. La elección de los disolventes orgánicos depende de la naturaleza de la fase estacionaria (Berrueta et al. 1995).



**Figura 2.** Formatos utilizados en EFS: a) jeringa, b) cartucho y c) discos. Tomado de Canosa, 2008.

Entre las múltiples ventajas que presenta destaca las siguientes: reducción del volumen de disolventes, por lo tanto menor generación de residuos, tiempo de análisis, costos, cantidad de muestra, manipulación sencilla de efectuar, ausencia de emulsiones y una mayor variedad de fases estacionarias de diferente polaridad para emplearse (ver **Tabla 4**). Dentro de sus principales limitaciones es que no se puede aplicar para muestras sólidas o líquidas que sean muy viscosas, los compuestos con elevado  $K_{ow}$  tienden a presentar bajos recobros.

**Tabla 4.** Adsorbentes empleados para EFS. Tomado de Canosa Rodríguez, 2008.

Adsorbente	Tipo de fase	Estructura
<i>Octadecilsilano (C18)</i>	Invertida	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>
<i>Octilsilano (C8)</i>	Invertida	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>
<i>Fenilsilano</i>	Invertida	-Si-Ph
<i>Sílice</i>	Normal	-Si-OH
<i>Cianopropil</i>	Normal	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CN
<i>Diolsilano</i>	Normal	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> OH
<i>SCX</i>	Cambiador iónico	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<i>SAX</i>	Cambiador iónico	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
<i>CBA</i>	Cambiador iónico	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COO <sup>-</sup>
<i>Amberlita XAD-2</i>	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
<i>Bond Elut ENV</i>	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
<i>Isolute ENV+</i>	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
<i>LiChrolut EN</i>	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
<i>Oasis HLB</i>	Polimérica	Divinilbenceno-vinilpirrolidona

El proceso de EFS consta de las siguientes 4 etapas básicas, ilustradas en la **Figura 3**:

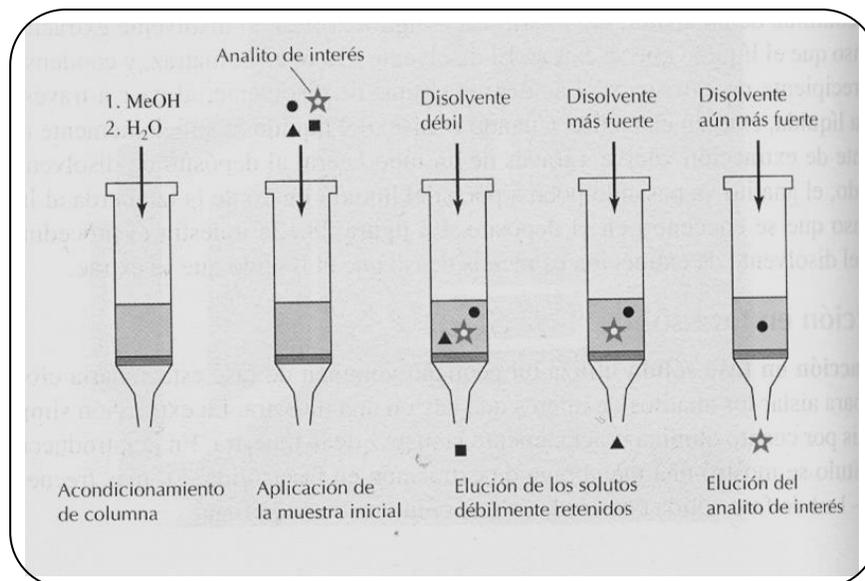
**1.-** Acondicionamiento o activación del adsorbente. Una vez empacado el cartucho con la fase estacionaria. Se hace pasar a través del cartucho un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, solvatando los grupos funcionales de la fase estacionaria, humectando el material

de empaque, eliminando así las impurezas que estén retenidas en la fase y facilitando la transferencia de la muestra.

**2.- Carga de la muestra.** Se aplica la muestra desde la parte superior del material adsorbente. El objetivo de esta etapa es retener cuantitativamente el analito. Algunos contaminantes pueden pasar sin retenerse, en cambio otros componentes de la matriz pueden retenerse en la superficie del adsorbente.

**3.- Lavado de adsorbente o eliminación de interferencias.** Se utilizan disolventes con gran afinidad por las interferencias sin desplazar a los analitos. Permite la eliminación de cualquier resto de compuestos de la matriz que se han retenido en el adsorbente. Una etapa de secado también puede ser aconsejable para matrices acuosas, para eliminar trazas de agua del sorbente sólido. Esto eliminará la presencia de agua en el extracto final, que, en algunos casos, puede dificultar la posterior concentración del extracto y/o el análisis.

**4.- Elución de analitos.** Con un disolvente apropiado a flujo constante se recupera el analito de la fase estacionaria sin la eliminación de los componentes de la matriz retenidos. Por lo general se utiliza un pequeño volumen de disolvente orgánico, aunque también se puede realizar una desorción térmica (Cromlab, 2017; Camel, 2003; Thurman & Mills, 1998).



**Figura 3.** Pasos en una extracción en fase sólida. Tomado de Harris, 2001.

### 2.3.2 Dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

La DMFS es una técnica de preparación de muestra desarrollada en 1989 por Barker S.A, este procedimiento surge como una modificación a la EFS. Por su simplicidad y flexibilidad se le ha dado múltiples usos, encontrando aplicación particular como un proceso analítico para la extracción y fraccionamiento de muestras biológicas sólidas, semisólidas y viscosas. Las ventajas que presenta respecto a las técnicas clásicas de extracción son: la pequeña cantidad

de muestra que se requiere, es un proceso rápido que no requiere instrumentación costosa, se obtienen recuperaciones eficientes de los analitos de estudio, es una técnica versátil como EFS y eco-compatible.

La DMFS permite el fraccionamiento completo de los componentes de la matriz de la muestra así como la capacidad para eluir selectivamente un único compuesto o varias clases de compuestos a partir de la misma muestra. Ha sido más frecuentemente aplicada al aislamiento de fármacos, herbicidas, pesticidas y otros contaminantes de los tejidos animales, frutas y verduras. La eficiencia y selectividad depende de varios factores en su mayor parte estos son los mismos factores que son reconocidos como influyentes en el rendimiento de un procedimiento de EFS entre los cuales destacan: naturaleza del adsorbente o dispersante, utilización de coadsorbentes, naturaleza de la matriz, secuencia de elución, naturaleza del disolvente (Barker, 2000, 2007).

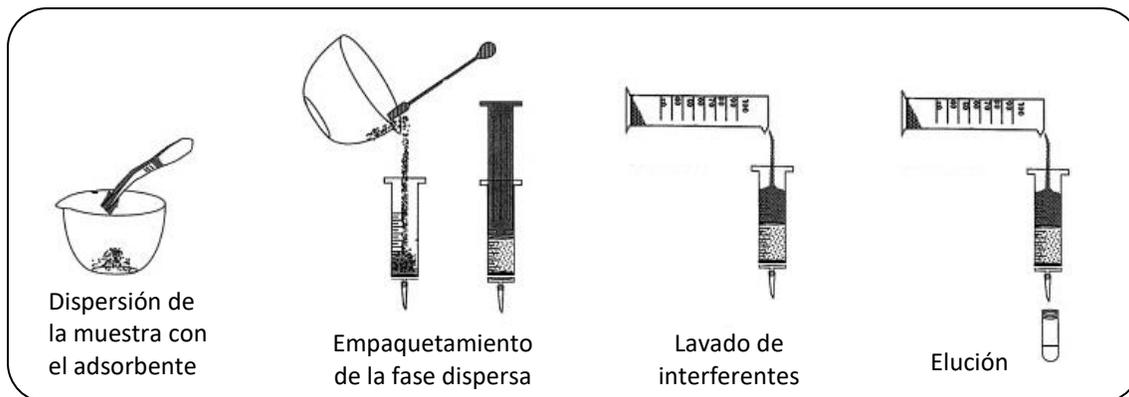
El procedimiento general de esta técnica consiste en 4 pasos fundamentales (ver **Figura 4**):

**1.-** Dispersión de la muestra. Primero se lleva a cabo un maceramiento manualmente de la muestra con el adsorbente previamente acondicionado y seco, el cual debe de ser a fin a los analitos, hasta adquirir una mezcla homogénea de un tamaño de partícula pequeño y constante sobre un mortero de ágata, paso que tarda unos 30 segundos. No se deben emplear morteros de porcelana u otros materiales porosos porque se ha demostrado que conducen a la pérdida de la muestra y del analito. La función de realizar este triturado es romper las cadenas lipídicas de las matrices, es decir el adsorbente sirve como abrasivo, disgregante y dispersante. Así de esta manera la muestra se dispersa sobre la superficie del material de soporte de fase unida, produciendo a través de interacciones hidrófobas e hidrófilas de los diversos componentes, una fase-carácter mixto único para llevar a cabo el aislamiento del analito. La proporción muestra-adsorbente varía de acuerdo al tipo de matriz y de adsorbente que se utilice, de manera general la proporción adecuada para una buena extracción es 1:4 muestra-adsorbente.

**2.-** Empaquetamiento. El material mezclado se transfiere y se envasa en una columna adecuada del mismo tipo que se utilizan en EFS, para llevar a cabo la elución secuencial con disolventes.

**3.-** Lavado de interferentes. Con algún disolvente apropiado o secuencia de disolventes adecuada se pueden eliminar posibles interferencias que se encuentran presentes en la matriz.

**4.-** Elución de analitos. Empleando un disolvente apropiado, que debe tener una mayor afinidad por el soluto que la que tiene por el adsorbente, se solubiliza el compuesto de elección y se recolecta el extracto para su posterior análisis por CG o CL (Barker, 2007; 2000).



**Figura 4.** Pasos en la dispersión de matriz en fase sólida. Adaptado de Barker, 2007.

## 2.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar física y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla; consta de dos fases, una fija que suele llamarse estacionaria y una móvil, que influye permanentemente durante el análisis y que en este caso es líquida.

### 2.4.1 Diversidad cromatográfica

Todas las separaciones cromatográficas, incluyendo HPLC operan bajo el mismo principio básico; separación de una muestra en sus partes constituyentes debido a la diferencia en las afinidades relativas de diferentes moléculas de la fase móvil y la fase estacionaria utilizada en la separación. Dependiendo del sistema que se emplee de fase estacionaria en el proceso se habla de: cromatografía fase normal, cromatografía fase reversa, de exclusión por tamaño y de intercambio iónico.

Con base en las polaridades relativas de la fase móvil y la fase estacionaria, se distinguen los tipos de cromatografía. Se le conoce como cromatografía de fase normal aquella en donde las fases estacionarias son de elevada polaridad y la elución se realiza con solventes relativamente no polares como etiléter, cloroformo y n-hexano. En la cromatografía en fase inversa, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia un hidrocarburo, y la fase móvil es un solvente relativamente polar como agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano.

En la cromatografía en fase normal, el componente menos polar se eluye primero, al aumentar la polaridad de la fase móvil ocasiona una disminución del tiempo de elución. En cambio con la cromatografía de fase inversa, los componentes más polares aparecen primero y un aumento de la polaridad de fase móvil incrementa el tiempo de retención.

Los empaques de fase unida químicamente se llaman de fase inversa cuando el revestimiento enlazado tiene un carácter no polar, y de fase normal cuando el revestimiento

contiene grupos funcionales polares. Se calcula que más de tres cuartas partes de todas las separaciones mediante HPLC se llevan a cabo en la actualidad en columnas con empaques de fase inversa.

La principal ventaja de las separaciones en fase inversa es que el agua se puede utilizar como fase móvil. El agua es barata, no tóxica, es un solvente transparente a la radiación UV y compatible con los solutos biológicos. Lo más común es que el grupo R del siloxano en estos revestimientos sea una cadena C8 (n-octilo) o una cadena C18 (n-octildecilo). Para el caso de rellenos comerciales de fase normal unida químicamente, R en la estructura del siloxano es un grupo funcional polar como: ciano ( $-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$ ), diol ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ), amino ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ ) y los dimetilamino ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ).

En este trabajo se hace uso específicamente de la cromatografía de reparto en fase inversa con fase estacionaria químicamente enlazada con grupos C18, la cual es una técnica de separación de compuestos orgánicos neutros, adecuada para compuestos no polares o de mediana polaridad. Se basa en el equilibrio del soluto entre dos fases. La fase estacionaria que está unida químicamente a la superficie del soporte sólido y la fase móvil. La fase estacionaria es no polar (C18) y la fase móvil es polar (MeOH:H<sub>2</sub>O). La elección de la fase móvil es fundamental ya que si presenta una fuerza de elución alta, eluirá a las especies retenidas más rápidamente que una con menor poder eluyente. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes (comúnmente agua/metanol/acetonitrilo); algo importante es que deben ser grado HPLC, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna. Cuando se mantiene constante la composición de la fase móvil durante toda la separación, se denomina isocrática.

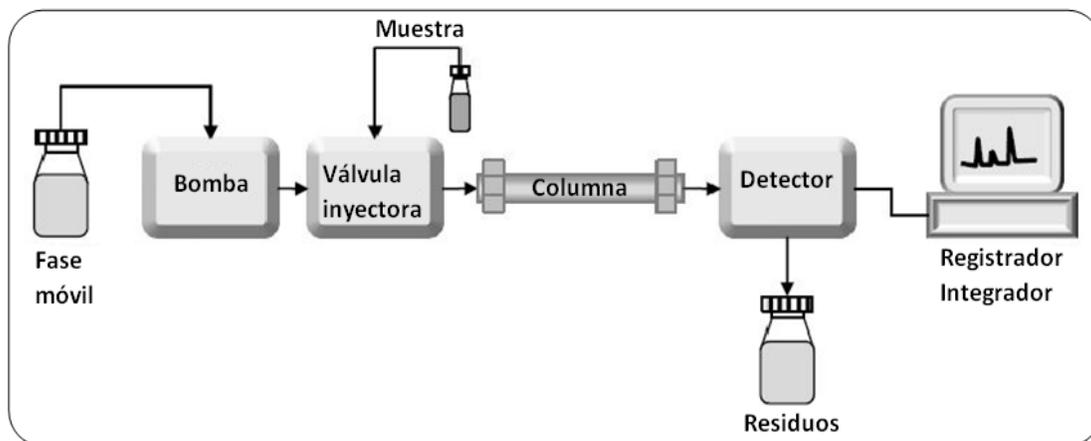
Sus aplicaciones van desde compuestos no polares con masas <5000, muestras solubles en disolventes no polares, adecuada para el análisis de moléculas no ionizantes, insolubles en agua.

## 2.4.2 Instrumentación

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución típico se muestran en la **Figura 5**. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes grado HPLC, con el fin de evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna o burbujas que interfieran con el sistema de detección por lo que es necesario filtrarlos y desgasificarlos antes de que pasen por la columna. Esta fase puede almacenarse en recipientes de vidrio o acero inoxidable mientras que, por un sistema de bombeo pasa por toda la tubería y la columna cromatográfica. La bomba con una presión y flujo constante envía el

disolvente hacia la válvula inyectora que es una válvula de seis vías que permite introducir a la fase móvil con la muestra, la cual es contenida en un *loop* de volumen calibrado en la misma válvula.

Luego de colocar a posición de *inyección* la válvula, la muestra es arrastrada por el flujo hacia la columna para la separación de sus componentes. Generalmente estas columnas constan de un recubrimiento exterior de acero inoxidable con diámetro interno uniforme. Su empaquetamiento difiere en tamaño, dimensiones y relleno dependiendo de la naturaleza del analito que se ha de separar. En muchas ocasiones, para aumentar la vida de la columna analítica se coloca entre la válvula y la columna una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. Los componentes de la mezcla pasan al detector, éste se explica con más detalle en el apartado 2.4.2.1. El cual da una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia; solo la señal es enviada al registrador que a su vez da un cromatograma de intensidad en función del tiempo y el flujo es enviado a un recipiente de residuos para su posterior desecho.



**Figura 5.** Esquema de los componentes de un HPLC. Adaptado de <https://goo.gl/E6eaj3>

### 2.4.2.1 Detectores

En HPLC existen dos tipos básicos de detectores: 1.-Los basados en una propiedad de la disolución. 2.-Los basados en una propiedad del soluto. El detector se coloca al final de las columnas, responde a la concentración del soluto en función del tiempo, obteniéndose una serie de picos y generando un gráfico que se denomina cromatograma. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra.

Las características de los detectores tanto en CG como en CL es que deben de poseer sensibilidad adecuada, estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal para los solutos, tiempo de respuesta reducido, no destruir la muestra, alta confiabilidad y sencillo manejo. Algunos de los detectores más usados en HPLC son: detectores de absorbancia ultravioleta-visible, detectores de fluorescencia, detectores de índice de refracción, detector de dispersión de luz,

detectores electroquímicos, detectores por espectrometría de masas. En este trabajo se usaron los dos primeros que a continuación se describen.

**Detector de UV-Vis:** Son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Las fuentes con deuterio o filamentos de tungsteno con filtros de interferencia proporcionan una forma sencilla de detectar las especies absorbentes. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbancia se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.

**Detector de fluorescencia:** En la mayoría de ellos, la fluorescencia se detecta por medio de un transductor fotoeléctrico colocado  $90^\circ$  respecto al haz de excitación. Una ventaja inherente de los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad que resulta ser mayor por más de un orden de magnitud que la mayoría de los procedimientos de absorción. Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio y uno o más filtros para aislar la fuente de radiación. Los instrumentos más complejos consisten en una fuente de xenón y emplean un monocromador para aislar la radiación fluorescente.

### 2.4.3 Definiciones de parámetros cromatográficos

**Tiempo muerto ( $t_0$ ):** Es el tiempo que tarda en pasar un soluto no retenido a lo largo de la columna

**Tiempo de retención ( $t_r$ ):** Tiempo necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección a través de la columna, hasta el detector, en el punto máximo del pico del soluto.

**Factor de capacidad ( $k'$ ):** También conocido como factor de retención es un parámetro que se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en las columnas.

**Selectividad ( $\alpha$ ):** Este factor se define en un sistema cromatográfico para dos solutos A y B, como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B, y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza, A.

**Eficiencia ( $N$ ):** De una columna cromatográfica depende del ensanchamiento de la banda que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna. La medición cuantitativa de la eficiencia se expresa en términos de número de platos teóricos. Éste refleja el número de veces que el soluto se reparte entre las dos fases durante su paso a través de la columna.

**Resolución cromatográfica ( $R_s$ ):** Medida cuantitativa de la capacidad de la fase estacionaria para separar dos analitos A y B.

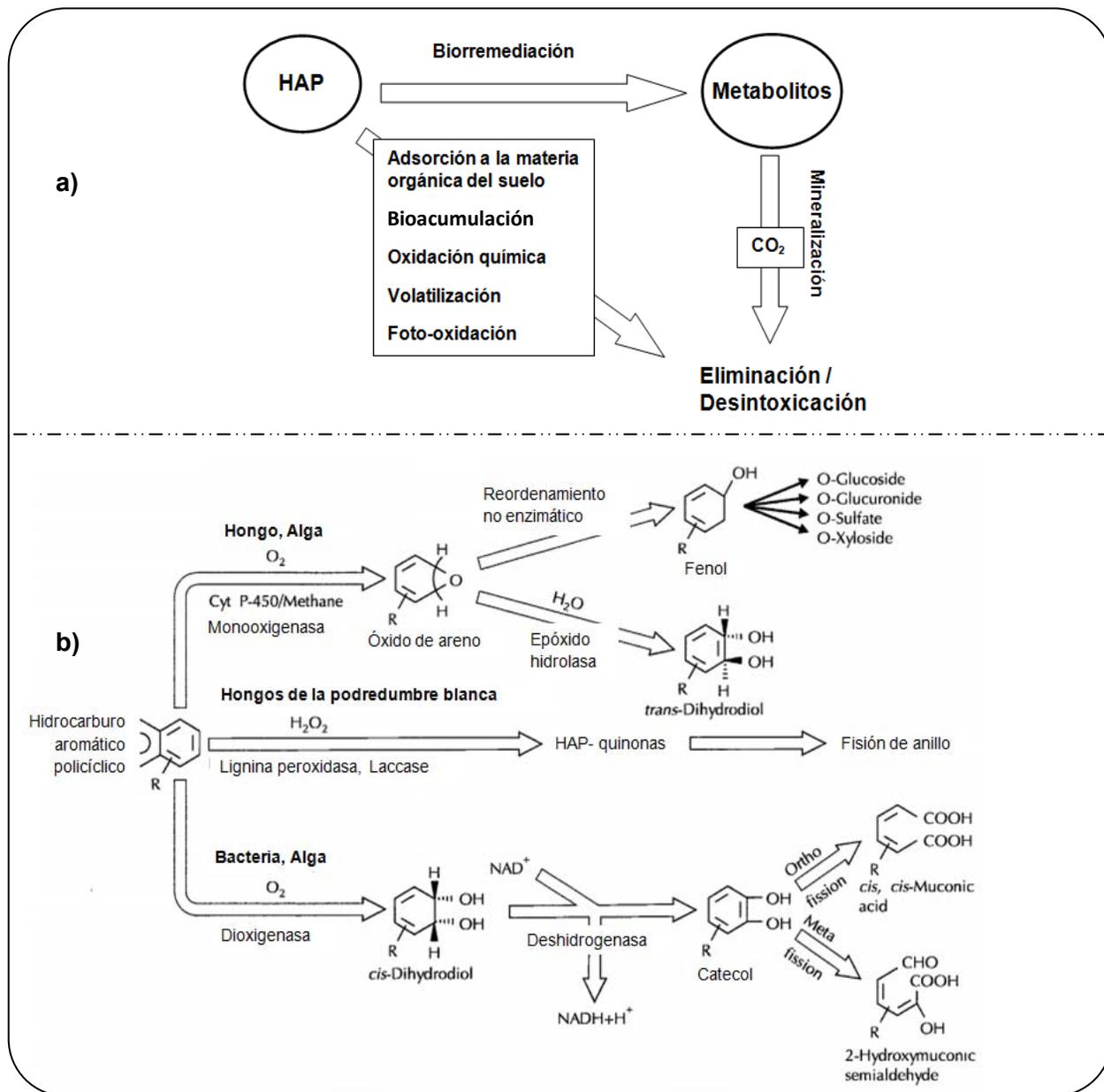
## 2.5 Biodegradación y biorremediación

Los HAPs son contaminantes presentes en el aire, suelo, medios acuáticos, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas. La persistencia de HAPs en el medio ambiente depende de sus características físicas y químicas. En el aire son degradados por foto-oxidación, en suelo y agua pueden someterse a foto-oxidación, oxidación química, volatilización, bioacumulación, adsorción y adhesión a la matriz del suelo (Juhasz & Naidu, 2000; Cerniglia, 1993).

La limpieza de los sitios contaminados ha puesto en marcha alternativas para la restauración de los daños ambientales. Varios métodos físicos y de tratamiento químico, como la incineración, dechloración por catálisis básica, oxidación UV, la fijación, la extracción con disolventes, etc., ya están en la práctica. Sin embargo presentan desventajas como el costo, la complejidad, carga reguladora, en muchos casos, no destruyen los compuestos contaminantes por completo, son procesos muy lentos que pueden acelerarse introduciendo conjuntos de microorganismos en los ambientes contaminados como bacterias, hongos, plantas o algas (Ghosal et al., 2016; Gan et al., 2009; Ferrera-Cerrato et al., 2006). Desde los años 1970, la investigación sobre la degradación biológica de HAPs ha demostrado que las bacterias, hongos y algas poseen capacidades catabólicas que pueden ser utilizadas para la descontaminación de suelos y agua (Juhasz & Naidu, 2000).

Con el fin de resolver este problema se ha propuesto una técnica de limpieza eficiente, ecológica, a un costo reducido y en condiciones ambientales conocida como biorremediación, que se está mejorando progresivamente. Esta técnica utiliza y manipula las capacidades de desintoxicación de los organismos vivos para convertir desechos orgánicos peligrosos incluyendo xenobióticos (sustancia sintética extraña al ser viviente, excluye vitaminas y hormonas) en productos inocuos, a menudo dióxido de carbono y agua. Sin embargo, a veces es posible que el contaminante se transforme en un producto final más tóxico. Es por esto que es esencial confirmar que el contaminante es completamente mineralizado al final del tratamiento (Ghosal et al., 2016).

La biodegradación se define como el proceso natural por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas transformándolas en moléculas más pequeñas y no tóxicas. La biorremediación se define como el empleo de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes del suelo o del agua. En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de microorganismos, aunque algunos se basan en la introducción de cepas definidas de bacterias u hongos, algas (especialmente cianobacterias o algas azules) y plantas genéticamente modificadas (Ferrera-Cerrato et al., 2006; Juhasz & Naidu, 2000). A continuación en la **Figura 6** de manera general se esquematiza la degradación de los HAPs.



**Figura 6.** Degradación de HAPs, adaptado de Cerniglia 1993. a) Proceso del destino de los HAPs en el medio ambiente. b) Etapas iniciales en las vías metabólicas microbianas para la oxidación (biodegradación) de HAPs.

En las últimas décadas, ha habido un gran progreso en el estudio de la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Las microalgas son uno de los principales productores de energía primarios en los ecosistemas acuáticos, y juegan un papel vital en el destino de los HAPs en esos entornos. En comparación con las bacterias y los hongos, se ha prestado relativamente poca atención a la biodegradación de HAPs de alto peso molecular por microalgas (Ghosal et al., 2016). La biorremoción de HAPs ha sido demostrada en microalgas como *Prototheca zopfii*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus acutus*, *Ankistrodesmus braunii*, *Chlamydomonas ulvaensis*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus brasiliensis*, el fitoflagelado *Euglena gracilis* y las cianobacterias *Anabaena cylindrica*,

*Phormidium foveolarum*, *Oscillatoria sp* y *Agmenellum quadruplicatum*, son eficientes para degradar diversos compuestos orgánicos incluyendo derivados del petróleo y HAPs (Ghosal et al., 2016; Ferrera-Cerrato et al., 2006). En otros estudios se ha evaluado la oxidación del BaP por la microalga *S. capricornutum*, resultando la identificación de la formación de los productos de biodegradación: *cis*-4,5-, 7,8-, 9,10- y 11,12-BaP-dihidrodióles, que implica la participación de un sistema de enzimas llamadas dioxigenasas, similar a los del sistema de degradación de HAPs por bacterias, pero diferente de los hongos (organismos eucariontes) para los que se implica un sistema de monooxigenasas (Ghosal et al., 2016; Juhasz & Naidu, 2000; Warshawsky et al., 1988).

La eficacia de la biorremediación se ha investigado principalmente en condiciones ideales de laboratorio, con un pH casi neutro y a temperatura mesófila (temperatura óptima de crecimiento de un organismo está entre 15 y 35°C). Sin embargo, en la situación real, la biorremediación sólo puede ser eficaz en los sitios donde las condiciones ambientales permiten el crecimiento microbiano y expresen la actividad enzimática asociada de manera que los microorganismos pueden atacar enzimáticamente los contaminantes transformándolos en productos inocuos. Numerosos factores bióticos y abióticos (tales como la temperatura, el pH, el oxígeno, la disponibilidad de nutrientes y la biodisponibilidad de los contaminantes por su baja solubilidad en agua y fuerte adsorción a la matriz del suelo) aparentemente pueden diferir de un sitio a otro, lo que a su vez puede influir en el proceso de biorremediación en esos entornos ya sea inhibiendo o acelerando el crecimiento de los microorganismos degradantes (Ghosal et al., 2016; Cerniglia, 1993).

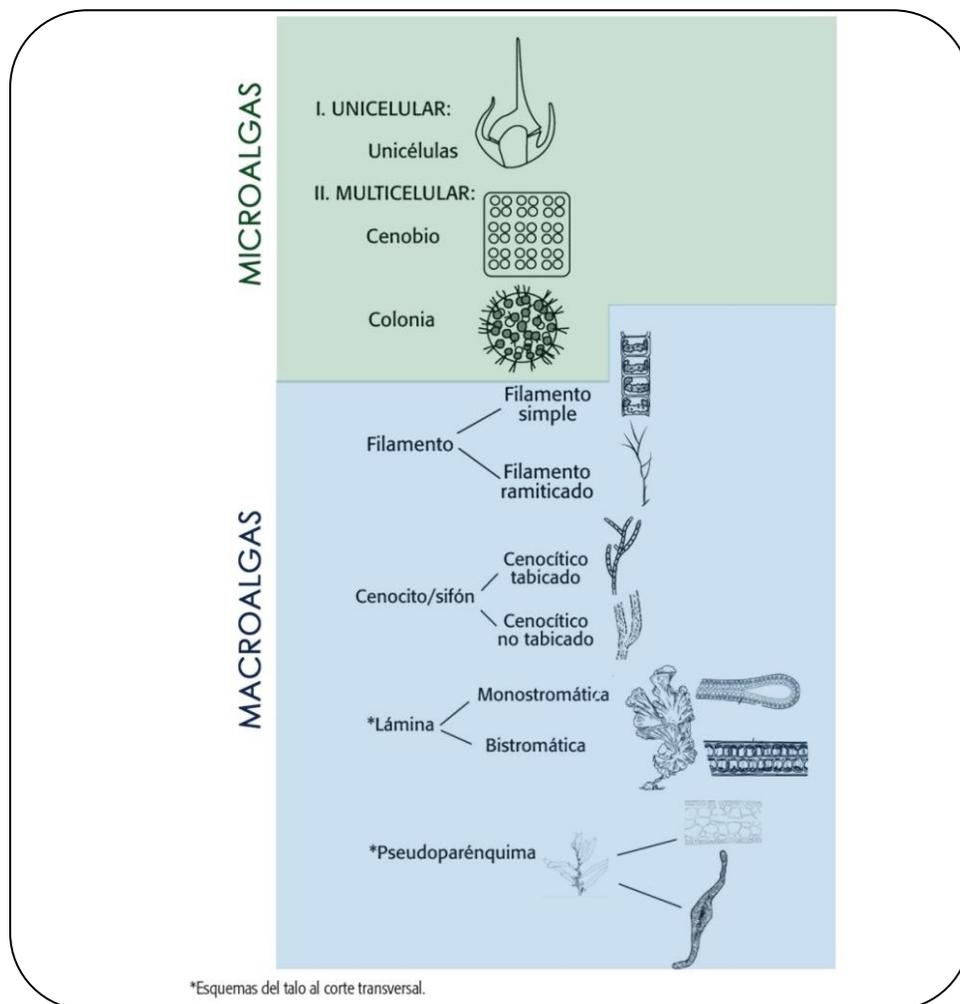
## **2.6 Generalidades de las microalgas**

Las algas representan a un grupo de microorganismos residentes en numerosos hábitats, aunque predominantemente se encuentran en medios acuáticos o muy húmedos (Dreckmann, 2013). Las algas son un grupo de organismos acuáticos con metabolismo autótrofo (son capaces de sintetizar su propio alimento) que presentan como pigmento fotosintético primario la clorofila A, característica que comparten con las plantas. La clorofila A es un pigmento fotosintético, alcanza un espectro de absorción de luz de 663-430 nm. Sin embargo también presentan otro tipo de clorofilas y pigmentos accesorios para realizar de manera óptima la fotosíntesis. Además de la clorofila A, encontramos a la clorofila B y la clorofila C (en sus formas C1 y C2).

A pesar de la controversia generada en torno a su clasificación biológica y a su estrecha relación con otros grupos, las algas comparten una serie de características propias que las identifican como grupo: no presentan raíz, tallo y hojas y características comunes que las han mantenido como una agrupación artificial. La organización que presentan, con excepción de los

representantes de las algas verde azules es de tipo eucariota. En contraste, las algas verde-azules, presentan una organización celular tipo procariota (Dreckmann, 2013). En cuanto a su nutrición son principalmente autótrofos (fotoautótrofos o quimioautótrofos), la fotosíntesis es su principal vía de nutrición, sin embargo existen grupos que presentan un tipo de nutrición heterótrofa (osmotrófica, fagotrófica o saprobiótica). Para su crecimiento requieren de varios factores como son los nutrientes, la fuente de nitrógeno (amoniaco, nitrato, nitrito), fósforo, dióxido de carbono, así como la disponibilidad de energía lumínica sobre un periodo diario de fotosíntesis.

Las algas son un conjunto de organismos, muchos de los cuales son unicelulares con tamaños entre 3-10  $\mu\text{m}$  por lo que forman distintos niveles de organización, grados de complejidad morfológica y fisiológica. Se reconocen diferentes tipos de organización, comenzando desde el nivel unicelular que es el más sencillo hasta el pseudoparénquima de las algas pardas que es el más complejo (Dreckmann, 2013). A grandes rasgos como se muestra en la **Figura 7** podríamos categorizarlas como microalgas y macroalgas de acuerdo a su organización visual.



**Figura 7.** Niveles de organización de las algas clasificados de acuerdo al incremento en complejidad estructural. Adaptado de (Dreckmann, 2013).

Las algas pueden reproducirse por dos vías, la asexual, fisión binaria para algas verde-azules y en otras algas unicelulares es por mitosis. El método de reproducción asexual consiste simplemente en la división repetida de un mismo organismo, resultando el incremento de la biomasa en una población, no implica la recombinación genética.

Las algas habitan en ambientes acuáticos, suspendidas en la columna de agua (planctónicas) o asociadas a un sustrato (bentónicas), aunque también es posible encontrarlas, en el aire, suelo, rocas, corteza de árboles y hielos. También pueden vivir tanto en agua dulce como salada. Las condiciones de vida libre de las microalgas pueden ser simuladas en el laboratorio, su cultivo debe considerar los elementos de todo cultivo microbiano, así como las condiciones de su inoculación o siembra y las condiciones óptimas de crecimiento, temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes y pH varían ampliamente de una especie a otra (Dreckmann, 2013).

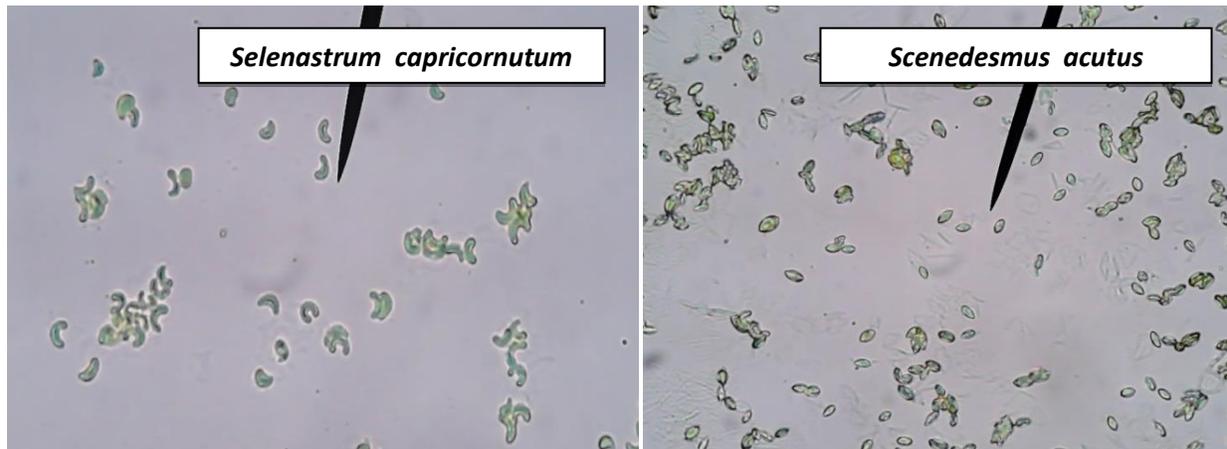
### **2.6.1 Generalidades de *Selenastrum capricornutum***

Es una microalga verde unicelular uninucleada, de morfología fusiforme o media luna, en general no forma agrupaciones ni aglomeraciones, su crecimiento se ve influido por la temperatura y tiene un volumen aproximado de 40-60  $\mu\text{m}^3$ . Esta especie es común en ecosistemas acuáticos de agua dulce, tanto en sistemas ricos en sales minerales, como en aquellos en donde hay una escasez de nutrientes. De acuerdo a la Universidad de Austin Texas, en Medio Bristol Proteosa Peptona, temperatura de 25°C a los 15-20 días alcanza una biomasa de 5 mg en 15 mL de medio (Montaño Montiel, 2012). Ha sido utilizada de manera extensa en bioensayos, razón por la cual existe considerable información sobre sus características de crecimiento y métodos de cultivo (León Santiago, 2016). Otros nombres con los que se puede identificar es *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Kirchneriella subcapitata*, *Ankistrodesmes subcapitatus* y *Raphidocelis subcapitata*.

### **2.6.2 Generalidades de *Scenedesmus acutus***

Es una microalga verde unicelular, la cual es una célula elipsoide u ovoide y su tamaño celular está entre 15-17.5  $\mu\text{m}$  de largo y entre 4-7  $\mu\text{m}$  de ancho, que se caracteriza por formar grupos de cuatro o más células, se reproduce en aguas ricas en nutrientes, especialmente con alto contenido en nitrógeno, ya sean ríos o arroyos, lagunas o lagos tanto permanentes como estacionales. En condiciones de laboratorio su crecimiento se da en Medio Bristol Proteosa Péptona alcanzando una biomasa de 5 mg en 15 mL al día nueve de crecimiento. A partir del sexto día forma aglomeraciones que pueden detectarse visualmente las cuales se disgregan al agitar el medio manualmente. También es conocida con el nombre de *Scenedesmus obliquus*

(Lürling & Van Donk, 1999). A continuación se presenta en la **Figura 8** la fotografía de las microalgas descritas anteriormente en los apartados 2.6.1 y 2.6.2.



**Figura 8.** Fotografías de *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*. Imagen propia, vista con objetivo de 40x.

## 2.7 Inmovilización de microalgas

Las microalgas son principalmente microorganismos convertidores de energía solar muy eficientes que pueden producir floraciones masivas (De-Bashan & Bashan, 2010). El atrapamiento de células dentro de esferas de alginato de calcio se ha convertido en la técnica más utilizada para inmovilizar células vivas. Este método versátil incluye aplicaciones en la industria, la medicina, la agricultura y la farmacéutica, que van desde la inmovilización de células vivas o muertas en biorreactores, la inmovilización de protoplastos vegetales para la micro propagación, la inmovilización de células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales y hasta el atrapamiento de células animales para la implantación de órganos artificiales (Smidsrød & Skjåk-Bræk, 1990).

Una célula inmovilizada se define como una célula viva que por medios naturales o artificiales, se evita que se mueva independientemente de su ubicación original a todas las partes de una fase acuosa de un sistema. Especialmente la inmovilización de microalgas, como parte de una tendencia global de la inmovilización de microorganismos en una variedad de matrices, se utiliza para una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas que comenzó hace más de 40 años (De-Bashan & Bashan, 2010).

La mayoría de las técnicas generales de inmovilización de microorganismos se pueden modificar fácilmente. El método más comúnmente utilizado es la inmovilización (también conocido como atrapamiento en red tridimensional o encapsulación en membranas) en los polímeros. La inmovilización de microalgas para el tratamiento de aguas residuales se basa en el principio de mantener las células vivas dentro de una matriz de gel, metabólicamente activas

el mayor tiempo posible durante el cual tienen movilidad muy limitada (De-Bashan & Bashan, 2010; Smidsrød & Skjåk-Bræk, 1990).

Hay reportes de la inmovilización de microalgas en geles de polisacáridos, como una forma experimental para utilizar estos microorganismos para el tratamiento de aguas residuales ya que aminora la mayor dificultad de recoger enormes poblaciones de células desarrolladas durante el tratamiento, lo que se complica en los tratamientos regulares con microalgas libres.

Por consiguiente para la inmovilización se han empleado polímeros de polisacáridos naturales provenientes de algas como alginato, carragenina, agar, agarosa, quitosano y sintéticos como la acrilamida, poliuretano, polivinilo y resinas. En particular el alginato es el polímero de elección, está hecho de diferentes proporciones y secuencias de ácidos manurónico y gulurónico extraídos de algas pardas, ya que son fáciles de manejar, no tóxico para los seres humanos, el medio ambiente y los microorganismos atrapados, legalmente segura para uso humano, disponible en grandes cantidades, y de bajo costo (Avendaño-Romero et al., 2013).

En los sistemas de inmovilización poliméricos, similar a otros sistemas de biofiltración, no hay separación física entre los microorganismos y el agua residual tratada. Los microorganismos vivos se inmovilizan dentro del polímero debido a que los poros de la membrana que los contiene son más pequeños que los microorganismos, por lo que el fluido fluye a través de ésta y sostiene su metabolismo y eventual crecimiento. El método de inmovilización tiene algunas ventajas principales como concentrar en grandes cantidades la biomasa que puede ser utilizada como un subproducto; tiene una alta resistencia a compuestos tóxicos dentro de las aguas residuales tratadas; se puede inmovilizar más de un microorganismo; es fácil de aplicar la técnica (De-Bashan & Bashan, 2010).

Algunas limitaciones que tiene la inmovilización con alginato es la baja estabilidad en concentraciones altas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , fosfatos, alta porosidad y biocompatibilidad ya que puede dañar algunas células sensibles por las cantidades pequeñas de polifenoles.

Por lo tanto las perlas de alginato deben tener una alta estabilidad mecánica y química, propiedades de hinchamiento controlables, bajo contenido de contaminantes tóxicos, pirogénicos e inmunogénicos, tamaño de poro definido y una distribución estrecha de poro. La difusión de moléculas pequeñas parece ser muy poco afectada por la matriz de gel de alginato, mientras que el transporte de moléculas más grandes puede estar restringido. La porosidad de los geles de alginato ha sido estudiada por varias técnicas, una de ellas es la micrografía electrónica de un gel de alginato de calcio al 2% que muestra poros que varían de 5 nm a 200 nm de diámetro (Smidsrød & Skjåk-Bræk, 1990).

### III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1 Materiales y equipos

##### 3.1.1 Disolventes

Agua destilada (CONQUIMEX, MÉXICO).

Agua grado cromatográfico obtenida con un desionizador modelo Simplicity UV (Millipore, USA).

Alcohol etílico al 96° (CONQUIMEX, MÉXICO).

Disolventes grado cromatográfico: Metanol, Acetonitrilo, Isopropanol (J.T. BAKER, USA).

##### 3.1.2 Estándares y reactivos de uso general

Estándar de Benzo[a]antraceno, pureza >99.2% (CHEMSERVICE, USA).

Estándares de metabolitos del BaA: *cis*-5,6-dihidrodiol, *trans*-8,9-dihidrodiol y *trans*-10,11-dihidrodiol, pureza >99% (MRI Global Research Institute Missouri, USA).

Ácido nítrico 10% v/v.

##### 3.1.3 Cultivos

Algodón, gasas.

Agar bacteriológico (MCD LAB, MÉXICO).

Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (SIGMA-ALDRICH, USA).

Fosfato dibásico de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) (J.T.BAKER, USA).

Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (J.T.BAKER, USA).

Nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) (MALLINCRODT, IRLANDA).

Peptona proteosa (MCD LAB, MÉXICO).

Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (J.T. BAKER, USA).

##### 3.1.4 Reactivos para inmovilización

Alginato de sodio (SIGMA-ALDRICH, USA).

Citrato de sodio (SIGMA-ALDRICH, USA).

Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (SIGMA-ALDRICH, USA).

##### 3.1.5 Microorganismos

Cepas puras de las microalgas *Selenastrum capricornutum* y *Scenedesmus acutus*, adquiridas de la colección de cultivos de algas de la Universidad de Austin, Texas (UTEX, USA).

### 3.1.6 Extracción de BaA y sus metabolitos

Balanza semi microanalítica con precisión 0.01mg modelo Discovery DV215CD (OHAUS, USA).

Filtros (*frit*) para reservorios de 1 y 6 mL (MACHEREY-NAGEL, ALEMANIA).

Jeringa de plástico 20 mL con adaptador para cartuchos con reservorios de 1 y 6 mL (HSW).

Matraz kitazato con tapón mono horadado con aguja de 5 mL, unido al sistema de vacío.

Micropipeta Eppendorf de 2-20, 25-250 y 100-1000  $\mu$ L con puntas Transferpette (BRAND, ALEMANIA).

Mortero de ágata de 30 mL con pistilo.

Reservorios de polipropileno de 1 y 6 mL para EFS y DMFS (VARIAN, USA).

Sílice Supelclean-LC C18, tamaño de partícula 45  $\mu$ m (SUPELCO, USA).

Viales ámbar con tapón de rosca de 40, 15 y 1.5 mL.

### 3.1.7 Sistema cromatográfico

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución constituido por dos bombas (LAB ALLIANCE SERIE II). Detector espectrométrico UV de longitud de onda variable modelo 200 (LINEAR INSTRUMENTS). Jeringa cromatográfica de 100  $\mu$ L (HAMILTON, USA). Software Clarity versión 2.8.1.584, para la adquisición de datos y tratamiento de los mismos. Válvula de inyección manual modelo 7125i con rizo (*loop*) de 20  $\mu$ L (RHEODYNE, USA). Calentador de columna modelo TS-130 con temperatura fijada en 30°C (PHENOMENEX, USA). Columna analítica Zorbax de fase reversa tipo Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, dp 3.5  $\mu$ m) empacada con sílice fase reversa dimetil (octadecil) silano (AGILENT TECHNOLOGIES, USA). Columna de guarda de acero inoxidable de 20x2.0 mm de diámetro interno (UPCHURCH SCIENTIFIC, USA), empacada en el laboratorio con sílice fase reversa, Nucleosil C18 tamaño de partícula de 5  $\mu$ m (MACHEREY-NAGEL, ALEMANIA). La **Figura 9** muestra la fotografía del cromatógrafo.



**Figura 9.** Cromatógrafo de líquidos Lab Alliance Serie II. Imagen propia.

### 3.1.8 Equipos e instrumentos

Agitador orbital, para crecimiento de microalgas (THERMO SCIENTIFIC, USA).

Asa bacteriológica de nicromel calibrada aproximadamente 1/100 negra d.i. 5 mm.

Autoclave eléctrica modelo 2540EL (TUTTNAUER, USA).

Balanza analítica con precisión 0.1 mg modelo Adventurer Pro AV114C (OHAUS, USA).

Baño de ultrasonido modelo 1510, para desgasificación de la fase móvil (BRANSON, USA).

Campana de flujo laminar modelo 11231 BBC86 (BIOBASE, CHINA).

Celdas de plástico para región visible, 10 mm paso óptico.

Centrífuga modelo 225 (FISHER SCIENTIFIC, USA).

Centrífuga SIGMA Osterode (HARZ, ALEMANIA).

Espectrofotómetro modelo Spectronic Genesys 5 (THERMO SCIENTIFIC, USA).

Filtros de nitrocelulosa estériles con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro para el sistema Sterifil (MILLIPORE, IRLANDA).

Frascos de vidrio de 250 mL (WHEATON).

Incubadora con temperatura y agitación para bioensayos, modelo SI-600R (JEIOTECH, COREA).

Lámpara con foco de luz amarilla 20 W marca (OSRAM, MÉXICO).

Lámpara fluorescente de 14 W marca (OSRAM, MÉXICO).

Material común: vasos de precipitados, pipetas Pasteur de vidrio, portaobjetos, espátulas de acero inoxidable, pinzas de disección, matraces erlenmeyer de 50, 300 mL, matraces volumétricos de 25 y 10 mL, tubos de ensayo de vidrio, pipetas graduadas, pipetas volumétricas 15.0 y 3.0 mL probetas de 100 y 10 mL, etc.

Mechero de bunsen.

Microscopio óptico marca (NATIONAL OPTICAL, USA).

Sistema de esterilización aséptico Sterifil (MILLIPORE, USA).

Temporizador (*timer*) para controlar los ciclos de luz/oscuridad.

Tubos Eppendorf de plástico de 15 mL para centrifuga.

### 3.2 Preparación de las disoluciones estándar de BaA y dBaA (s)

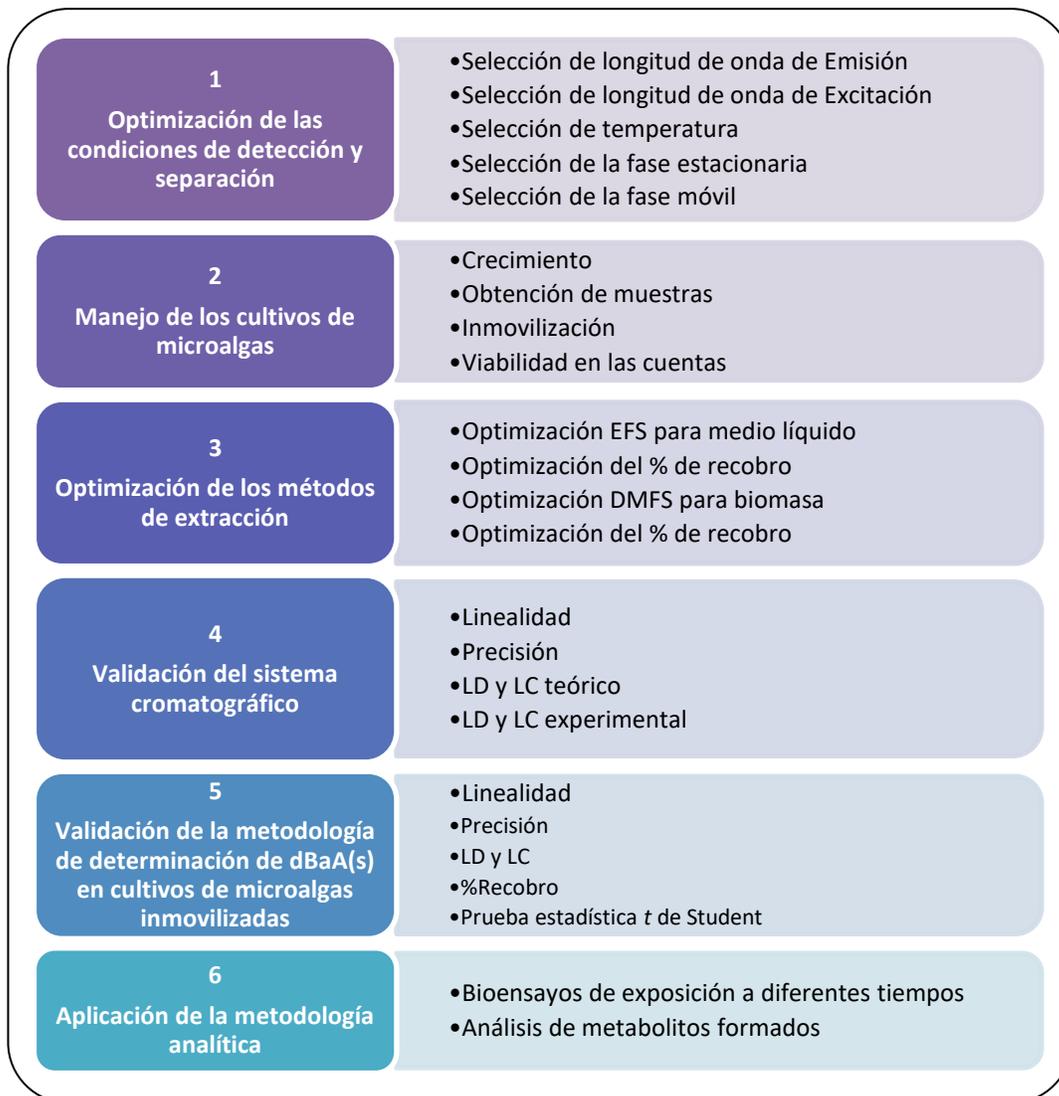
Las disoluciones de los estándares del BaA y sus metabolitos (dBaA) fueron preparadas en ACN y mantenidas en congelación a  $-15^{\circ}\text{C}$  en viales color ámbar. A partir de las disoluciones *stock* de concentración de 126.8  $\mu\text{g/mL}$  para BaA y 67, 78, 61  $\mu\text{g/mL}$  para los metabolitos 5,6-dBaA, 7,8-dBaA, 10,11-dBaA, respectivamente, se prepararon las soluciones utilizadas en este estudio. Se prepararon 25 mL de las disoluciones de BaA en concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$  y por separado una mezcla de los metabolitos 5,6-dBaA, 8,9-dBaA y 10,11-dBaA en concentraciones de 2, 4 y 4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. De esta última solución se tomó la alícuota correspondiente

disolviéndola en una mezcla de ACN:H<sub>2</sub>O 55:45% v/v para tener las concentraciones de trabajo usadas en la validación del sistema y del método, mostradas más adelante en las **Tablas 6 y 7**. La preparación de la mezcla de metabolitos se hizo para efectuar el monitoreo de los tres compuestos en una misma corrida cromatográfica, la optimización de las condiciones de separación y detección se efectuó con una disolución de 5,6-dBaA 100 ng/mL, 8,9-dBaA 100 ng/mL y 10,11-dBaA 103 ng/mL preparada en mezcla ACN:H<sub>2</sub>O 55:45% v/v.

### 3.3 EXPERIMENTACIÓN

#### 3.3.1 Esquema general de la experimentación

La experimentación desarrollada en el presente trabajo se puede clasificar en seis diferentes etapas (bloques) de acuerdo al esquema presentado en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Etapas desarrolladas en el proceso experimental.

### **3.3.2 Optimización de las condiciones de detección y separación**

#### **3.3.2.1 Selección de longitudes de onda óptimas para cada metabolito**

Antes de efectuar la separación de la mezcla de los tres metabolitos en estudio se seleccionaron las longitudes de onda óptimas para su detección inyectando disoluciones individuales de ellos en una columna Agilent Eclipse XDB-C18 4.6x150 mm y 5 µm dp y una fase móvil de MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30% v/v. En esta columna se había previamente probado en el grupo de trabajo que se puede separar a los tres metabolitos con la fase móvil indicada arriba (Hernández Camarillo, 2015).

Entonces, para optimizar las condiciones de detección, se realizaron barridos de excitación y emisión para cada uno de los analitos con el detector de fluorescencia (FD). Primero se hizo un barrido espectrométrico manteniendo fija la onda de excitación en 280 nm y variando la onda de emisión de 330 a 478 nm. Una vez seleccionada la onda de emisión adecuada se realizó otro barrido manteniendo la onda de emisión en 394 nm y variando la onda de excitación de 200 a 360 nm. Después de analizar el tamaño de los picos correspondientes a cada compuesto, cuya variación reflejara los espectros correspondientes, se buscó seleccionar las condiciones de excitación y emisión que fueran el mejor compromiso de respuesta para los tres solutos. Posterior a este análisis se siguió con la optimización, pero empleando las longitudes de onda determinadas en las cuales los tres metabolitos presentaban sus máximos de absorción de acuerdo a las posibilidades del detector de fluorescencia.

#### **3.3.2.2 Selección de la temperatura**

Se realizó el análisis con las condiciones cromatográficas anteriores y la detección adecuada, inyectándose la mezcla de los metabolitos y probando dos temperaturas para la columna analítica: 25°C y 30°C.

#### **3.3.2.3 Selección de fase estacionaria**

Se ensayaron diversas columnas cromatográficas con el fin de intentar mejorar la separación de los analitos y su tiempo de análisis, utilizando columna de guarda y las condiciones previamente establecidas de longitudes de onda, temperatura y fase móvil. La identificación de las columnas cromatográficas ensayadas se muestra a continuación:

- Columna Hypersil Green PAH 4.6x100 mm 5 µm dp.
- Columna Eclipse XDB-C8 de 4.6x150 mm 3.5 µm dp.
- Columna Eclipse XDB-C18 de 4.6x150 mm 5 µm dp.
- Columna Eclipse XDB-C18 de 4.6x150 mm 3.5 µm dp.

### 3.3.2.4 Selección de la fase móvil para la separación

Para la optimización de la fase móvil para la separación, se realizó la inyección de la solución estándar con la mezcla de los tres metabolitos, variando la composición de la fase móvil utilizando diferentes mezclas de MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40, 65:35 y 70:30% v/v a un flujo de 1 mL/min y con la columna Agilent Eclipse XDB-C18 4.6x150 mm y 3.5 µm dp. La medición del tiempo muerto se llevó a cabo con la inyección de 20 µL de una disolución de una sal inerte no retenida en el sistema cromatográfico, como lo es el nitrato de sodio, a una concentración de 100 mg/L. Con los tiempos de retención obtenidos de los metabolitos y con el tiempo muerto determinado, se calculó el factor de capacidad ( $k'$ ) de los metabolitos para cada proporción de fase móvil, que es el tiempo relativo que pasa el soluto en cada fase. Los valores de  $k'$  se calcularon usando la **Ecuación 1**, posteriormente se determinó la dependencia de  $k'$  en función del porcentaje de metanol, con el gráfico de  $\log k' = f(\% \text{metanol})$ .

$$k' = \frac{(tr - t_0)}{t_0} \dots \dots \dots \text{(Ecuación 1)}$$

Donde  $k'$  es el factor de capacidad,  $tr$  es tiempo de retención y  $t_0$  el tiempo muerto, ambos parámetros se obtienen del cromatograma.

### 3.3.3 Manejo de los cultivos de microalgas

#### 3.3.3.1 Crecimiento

Las microalgas fueron desarrolladas en los medios de cultivo sólidos usando tubos de ensayo de vidrio de 20x150 mm que permitieron la preservación de la cepa y en medios de cultivo líquidos ocupados para la realización de la validación analítica y bioensayos de exposición de este trabajo, empleando matraces de 300 mL y 50 mL, respectivamente.

##### 3.3.3.1.1 Medio sólido

En tubos de ensayo se colocaron 15 mL de Medio Bristol Proteasa Peptona y se les adicionó agar para tener una concentración de 1.5% p/v. Se les colocó un tapón de algodón y gasa como en los medios líquidos y se esterilizaron en autoclave. Inmediatamente después del proceso de esterilización se colocaron sobre una base de madera, de tal manera que los tubos quedaran inclinados, cuidando que el líquido no tocara el tapón, durante un lapso de 24 h, para su enfriamiento y gelificación. En condiciones asépticas se inoculó con una asada de biomasa de otro cultivo sólido y se colocó bajo las mismas condiciones de incubación que los medios líquidos (descritas en la siguiente sección).

### 3.3.3.1.2 Medio líquido

El crecimiento de las microalgas *S. capricornutum* y *S. acutus* se dio en medio de cultivo líquido Bristol Proteasa Peptona. La composición de este medio se presenta en la **Tabla 5**. Se colocaron 250 mL de Medio Bristol Proteasa Peptona en un matraz erlenmeyer de 300 mL, se tapó con una torunda de algodón envuelta en gasa y se metió a esterilización por autoclave (121°C, 30 min, 15 psi). Los medios de cultivo se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Bajo condiciones de asepsia se inocularon con las dos especies de microalgas, tomando una asada cargada de biomasa de los cultivos sólidos de cada cepa. Los cultivos se colocaron en agitación a 100 rpm por 3 h/día y bajo ciclos de iluminación de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, iluminadas con lámparas fluorescentes de 14 W dentro de cajas de madera que no permiten la entrada de luz ambiental, a temperatura ambiente, aproximadamente por 20 días hasta obtener un valor de absorbancia igual a uno. En la **Figura 11** se muestran fotografías de los medios sólidos y líquidos de crecimiento que se manejaron en este trabajo.

**Tabla 5.** Composición del medio Bristol-Proteasa Peptona.

#	Componente	Cantidad	Conc. de la solución stock	Conc. final
1	NaNO <sub>3</sub> (Fisher BP360-500)	10 mL/L	10 g/ 400 mL H <sub>2</sub> O	2.94 mM
2	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Sigma C-3881)	10 mL/L	1 g/ 400 mL H <sub>2</sub> O	0.17 mM
3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma 230391)	10 mL/L	3 g/ 400 mL H <sub>2</sub> O	0.3 mM
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma P 3786)	10 mL/L	3 g/ 400 mL H <sub>2</sub> O	0.43 mM
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma P 0662)	10 mL/L	7 g/ 400 mL H <sub>2</sub> O	1.29 mM
6	NaCl (Fisher S271-500)	10 mL/L	1 g/ 400 mL H <sub>2</sub> O	0.43 mM
7	Proteosa peptona	1 g/L		

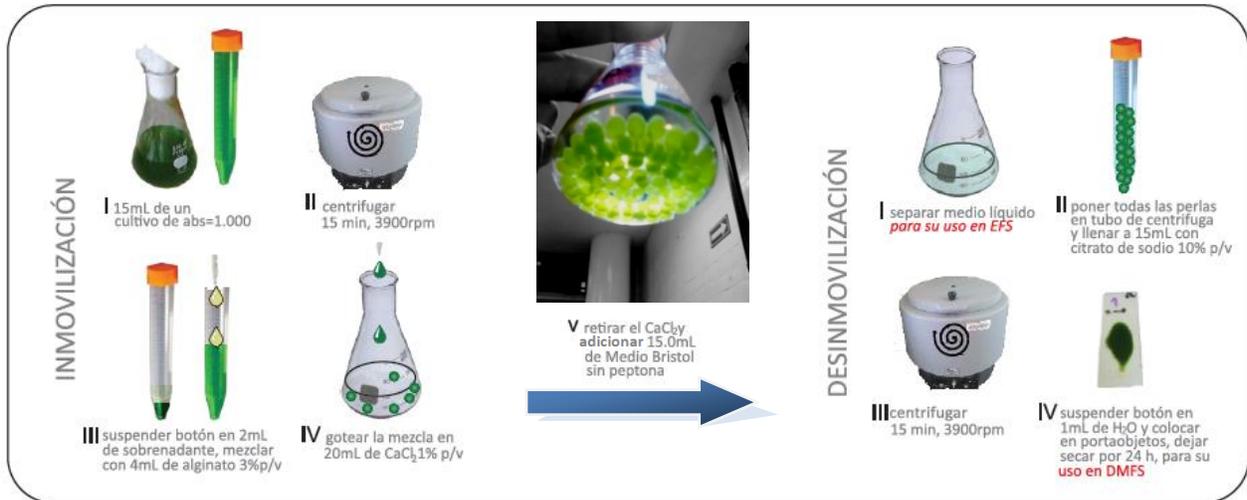
Las sales se disuelven en H<sub>2</sub>O destilada en el orden en que están presentadas, la solución final se almacena a temperatura ambiente. La cantidad de peptona se coloca a cada cultivo antes de esterilizar y lo correspondiente a la cantidad de medio que se requiera. Adaptado de <https://goo.gl/pb3lv6>.



**Figura 11.** Preservación de cultivos microalgales en medio líquido y sólido. Imagen propia.

### 3.3.3.2 Inmovilización de microalgas

La metodología para efectuar la inmovilización de las microalgas en cuentas de alginato se ilustra en la **Figura 12**.

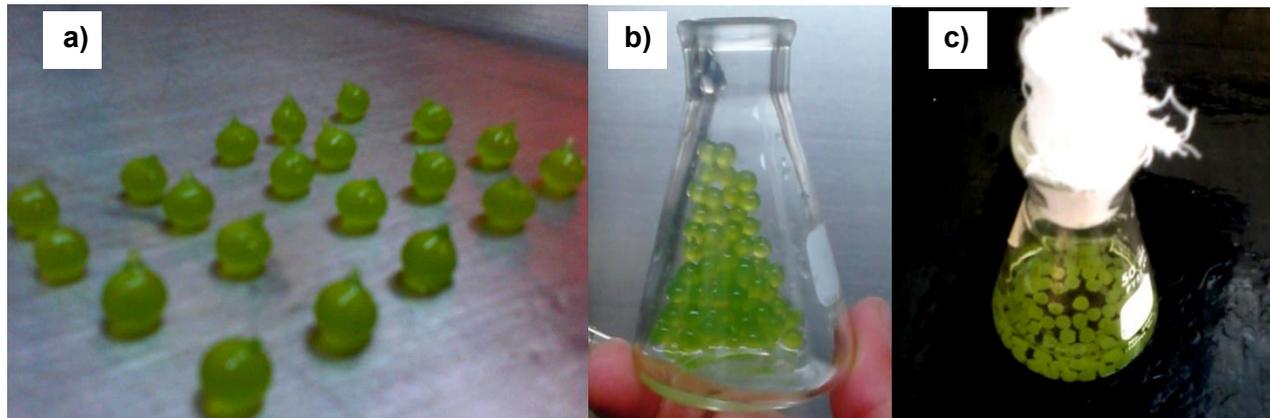


**Figura 12.** Metodología para la inmovilización de las microalgas en alginato de calcio y recuperación de la biomasa.

La inmovilización de las microalgas se efectuó de acuerdo al procedimiento previamente optimizado en el grupo de trabajo (Bernal Toris, 2015). Todo el material de vidrio ocupado y la disolución de  $\text{CaCl}_2$  al 1% p/v fueron esterilizados en autoclave eléctrica a  $121^\circ\text{C}$ , 15 psi por 30 min. La disolución de alginato de sodio al 3% p/v se esterilizó por filtración con el sistema *Sterifil* en zona aséptica. El crecimiento de las microalgas fue monitoreado semanalmente tomando pequeñas alícuotas del cultivo para medir su absorbancia en el espectrofotómetro UV-Vis. La longitud de onda de medición elegida fue 285 nm por ser la longitud de máxima absorción de la clorofila y una vez que los cultivos de microalgas alcanzaron una absorbancia de 1.000, equivalente a  $4.5 \times 10^6$  células/mL de cultivo para *S. capricornutum* (Olmos Espejel, 2013) y  $4.5 \times 10^6$  células/mL para *S. acutus* (Montaño Montiel, 2013) se tomaron alícuotas de 15 mL. Cada especie fue inmovilizada en cuentas por separado realizando la siguiente secuencia de pasos: la alícuota de 15 mL del cultivo en absorbancia de uno, se centrifugó a 3900 rpm por 15 min. Pasado ese tiempo, se separaron 13 mL del sobrenadante y el botón se resuspendió en el medio restante (aprox. 2 mL).

Dentro de la campana de flujo laminar las microalgas concentradas en los 2 mL del sobrenadante se mezclaron con 4 mL de la disolución estéril de alginato de sodio para obtener un volumen final de 6 mL. Después la mezcla alginato-microalgas fue goteada con una pipeta graduada de 10 mL, en 20 mL de solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  en un matraz de 50 mL para formar perlas. Las perlas con microalgas se dejaron 3 min en la solución de  $\text{CaCl}_2$  y posteriormente se descartó la disolución de  $\text{CaCl}_2$  y se hizo un enjuague con Medio Bristol estéril. Finalmente

las perlas se dejaron en contacto con 15 mL de Medio Bristol estéril (sin peptona). Siguiendo el procedimiento anterior se produjeron aproximadamente  $85 \pm 6$  perlas uniformes, translúcidas, con un diámetro aproximado de 3 a 4 mm (**Figura 13**).



**Figura 13.** Microalgas inmobilizadas en alginato de calcio. Imagen propia. En a) perlas separadas, b) perlas adheridas al vidrio del matraz después de retirar el medio líquido y c) perlas en medio Bristol.

### 3.3.3.3 Viabilidad de microalgas inmobilizadas y desinmovilización

Esta prueba se realizó con la microalga *S. acutus* inmobilizada en perlas de alginato de calcio. Las perlas en Medio Bristol se incubaron en condiciones de bioensayos por 72 h, debido a que éste era el tiempo máximo que durarían las exposiciones y la microalga en estado inmobilizado. Después de este tiempo se retiró el medio de cultivo y en condiciones asépticas se liberaron del alginato mediante centrifugación con una disolución de citrato de sodio al 10% p/v, un poco más concentrada de la que utilizó León Santiago, 2016 y Bernal Toris, 2015, con la finalidad de mejorar la etapa de desinmovilización. Aún en condiciones asépticas se desechó el sobrenadante y el botón se sembró en Medio Bristol Proteasa Peptona sólido. Se colocó dentro de caja de incubación y se monitoreó su crecimiento.

### 3.3.4 Optimización de los métodos de extracción por EFS y DMFS

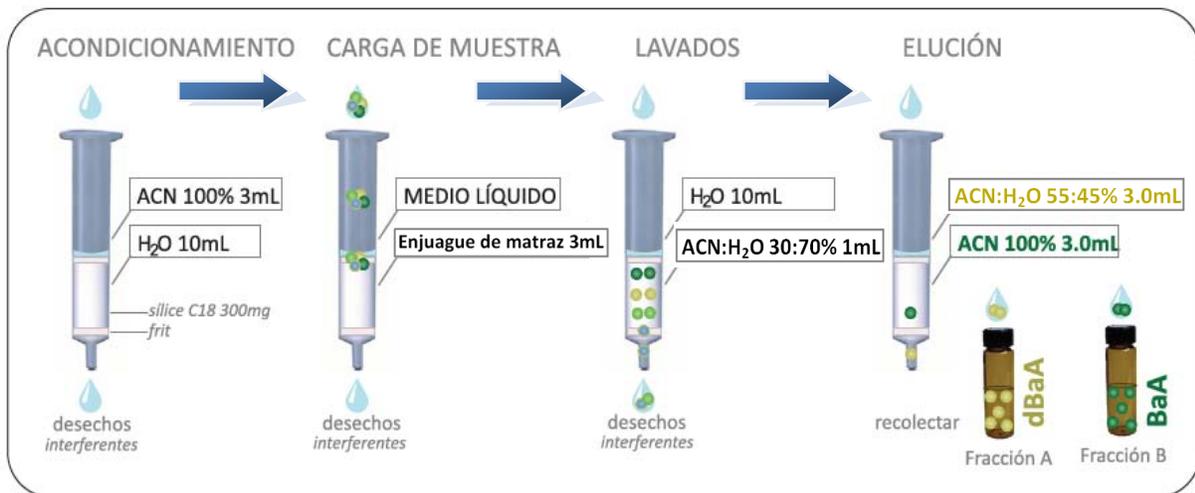
En este trabajo se modificó y optimizó la metodología de EFS y DMFS desarrollada previamente por García Cicourel, 2015, para la extracción de los metabolitos del BaA en cultivos de microalgas libres, porque en tales condiciones se presentaba fuga de los metabolitos durante la secuencia de lavados. La metodología final se describe más adelante en los apartados 3.3.4.2 y 3.3.4.3. Con estas modificaciones se consiguió aumentar el porcentaje de recobro de los mismos. Es de resaltarse que las secuencias de acondicionamiento, lavados y elución para la EFS y DMFS fueron por gravedad. Los eluatos colectados se conservaron en congelación a  $-22^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis, no dejando pasar más de 4 días para su análisis.

### 3.3.4.1 Acondicionamiento del adsorbente

Previo al uso de la sílice C18 para la extracción, ésta se activó empacándola en un cartucho de extracción y haciendo pasar metanol 100% en una relación de 2 mL por gramo de adsorbente y se dejó secar a gravedad por 24 h. Este proceso permite eliminar impurezas del material y activa la fase unida para asegurar una interacción consistente entre los grupos funcionales del adsorbente y los analitos (Sigma-Aldrich 2017).

### 3.3.4.2 Extracción en fase sólida

La **Figura 14** ilustra el procedimiento para realizar la extracción en fase sólida de los analitos que se encontraron en el medio líquido de cultivo que estuvo en contacto con las microalgas libres o inmovilizadas.



**Figura 14.** Metodología EFS para el medio líquido en contacto con las microalgas libres o inmovilizadas.

El proceso de EFS comenzó en condiciones no asépticas con la separación de las perlas de microalgas del medio líquido por decantación y en caso de las microalgas en estado libre, la separación del medio líquido mediante centrifugación. Se empacaron 300 mg de fase reversa C18 activada en medio de dos *frits* adentro de un cartucho de extracción de 6 mL, al cual se le pasó por gravedad 3 mL de ACN 100% y luego 10 mL de H<sub>2</sub>O, esto para su acondicionamiento antes de verter el medio líquido que estuvo en contacto con las microalgas. El medio líquido se hizo pasar a través del cartucho así como los 3 mL de H<sub>2</sub>O utilizada para enjuagar el matraz que lo contenía. Esto es seguido por la siguiente secuencia de lavados para quitar interferentes de la muestra: 10 mL de H<sub>2</sub>O y 1 mL ACN:H<sub>2</sub>O 30:70% v/v. Enseguida se aplicó el disolvente para la recuperación de los metabolitos, recolectando en viales color ámbar: 3 mL de ACN:H<sub>2</sub>O 55:45% v/v (Fracción A). Posteriormente se agregaron 3 mL de ACN 100% (Fracción B), para eluir al BaA (Olmos Espejel, 2013). Ambas fracciones se analizaron por HPLC, la Fracción A con FD y la Fracción B con detector UV.

El método utilizado por el grupo de trabajo para microalgas libres reporta la adición de 3.75 mL de isopropanol (iPrOH) puro dentro del matraz que contiene el medio líquido, quedando el iPrOH a una concentración de 20% v/v, con la finalidad de disminuir la interacción de los HAPs con el vidrio y obtener mejores porcentajes de recobro, antes de pasar el medio líquido por el cartucho (Velazco Cruz, 2011; Olmos Espejel, 2013; Díaz Rojas, 2015, García Cicourel, 2015). Mientras que para las microalgas inmovilizadas se pasa el medio líquido por el cartucho y posteriormente se enjuagaba el matraz que lo contenía con 3 mL de agua. No se emplea isopropanol al 20% para realizar el enjuague del matraz ya que el medio de cultivo que estuvo en contacto con las microalgas inmovilizadas contiene alginato residual que es precipitado al adicionarle isopropanol, lo que dificulta el paso de la muestra a través del cartucho (Bernal Toris, 2015, León Santiago, 2016).

### 3.3.4.3 Dispersión de matriz en fase sólida

La **Figura 15** muestra el procedimiento para realizar la dispersión de matriz en fase sólida de los analitos que se alojaron en la biomasa en microalgas libres e inmovilizadas.



**Figura 15.** Metodología de DMFS para la biomasa seca de microalgas libres o inmovilizadas.

Las perlas de microalgas separadas del medio líquido se colocaron en un tubo de centrifuga y se adicionó citrato de sodio al 10% p/v hasta llegar a la marca de 15 mL. El tubo cerrado se agitó manualmente por 15 segundos para disolver las perlas y después se metió a centrifugación 15 min a 3900 rpm para separar la biomasa. El sobrenadante fue desechado y el botón se resuspendió con 1 mL de H<sub>2</sub>O utilizando una pipeta pasteur de vidrio. Esta mezcla se goteó en un portaobjetos y se dejó secar durante 24 h. La biomasa seca se retiró del portaobjetos y se pesó. Ésta se colocó en un mortero de ágata y se le adicionaron 100 mg de sílice C18 (previamente activada), mediante un pistilo de ágata se mezcló suavemente a

biomasa tratando de no triturarla en la sílice porque se forman polvos *finos* que retardan el flujo del cartucho, hasta obtener una pasta homogénea. La mezcla obtenida se empacó en un cartucho de extracción de 1 mL que contenía un *frit*, dando pequeños golpes para compactar. Mediante la adaptación de un conector y una jeringa de 25 mL al cartucho se hicieron pasar 5 mL de H<sub>2</sub>O como lavado y 1.5 mL de ACN 55% v/v para obtener la Fracción A de los dihidrodioles y posteriormente 1 mL de ACN 100% para obtener la Fracción B del BaA; estos extractos se recuperaron en viales ámbar graduados.

### 3.3.5 Validación del sistema cromatográfico

#### 3.3.5.1 Linealidad del sistema

Para evaluarla linealidad del sistema, se inyectaron nueve disoluciones de los metabolitos del BaA de diferente concentración, al sistema cromatográfico, por triplicado. Las concentraciones evaluadas son mostradas en la **Tabla 6**. Una vez obtenida la respuesta correspondiente para cada nivel de concentración de los metabolitos en unidades de área del pico se construyó el gráfico de respuesta del detector en función de la concentración de cada uno de los compuestos, a la curva de calibración se le realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. La linealidad del sistema se evaluó con el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de cada curva, donde se utilizó un criterio de aceptación cuando  $r^2 \geq 0.99$ .

**Tabla 6.** Concentraciones de las disoluciones de metabolitos en las muestras empleadas para validación.

Validación	Nivel o Mezcla	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	dBaA	Concentración ng/mL								
Sistema	5,6-	2.5	5	12.5	25	50	125	225	300	500
	8,9- y 10,11-	5	10	25	50	100	250	450	600	1000

#### 3.3.5.2 Precisión

Evaluada como repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se determinó mediante la inyección por triplicado en el mismo día de una disolución estándar que contenía a los tres metabolitos en concentraciones 5, 10 y 10 ng/mL para 5,6-; 8,9- y 10,11-dBaA respectivamente. Así mismo la reproducibilidad se determinó en tres días diferentes realizando por triplicado la inyección de la misma solución estándar que la anterior. En ambos casos la variabilidad se evaluó con el parámetro de coeficiente de variación (%CV) obtenido con las áreas de cada analito. El coeficiente de variación se calculó con la **Ecuación 2**.

$$\%CV = \frac{\sigma}{x} (100) \dots\dots\dots (Ecuación 2)$$

Donde %CV es el coeficiente de variación expresado en porcentaje,  $\sigma$  es la desviación estándar y  $\bar{x}$  el promedio de las medias.

### 3.3.5.3 Límites de cuantificación y detección

Para la determinación experimental del límite de detección se inyectó por triplicado la disolución de concentración más baja usada en el estudio de linealidad del sistema y se fueron realizando diluciones hasta que el “software” del equipo determinó que la relación señal/ruido era igual a 3. El límite de cuantificación experimental se obtuvo cuando la relación señal/ruido del equipo era igual a 10 (ICH, 2005). La evaluación teórica de ambos límites se obtuvo con base en la curva de calibración de los metabolitos en un intervalo de concentraciones, de 2.5 a 25 ng/mL para el 5,6-dBaA y de 5 a 50 ng/mL para los metabolitos 8,9- y 10,11-dBaA, como se muestra en la **Tabla 6**. Para estos cálculos se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.3 Sb_0}{m} \dots\dots\dots (Ecuación 3)$$

$$LC = \frac{10 Sb_0}{m} \dots\dots\dots (Ecuación 4)$$

Donde  $LD$  es el límite de detección,  $LC$  el límite de cuantificación,  $Sb_0$  la desviación estándar de la ordenada al origen y  $m$  la pendiente obtenida mediante el ajuste de regresión por mínimos cuadrados.

### 3.3.6 Validación de los métodos para los cultivos de microalgas inmovilizadas

Toda la validación de la metodología de EFS-HPLC-FD y de DMFS-HPLC-FD para metabolitos del BaA como se describe anteriormente en el apartado 3.3.4.2 y 3.3.4.3 se realizó solamente con la microalga *S. acutus* inmovilizada. La fortificación correspondiente para cada nivel se hizo con el estándar de la mezcla de los tres metabolitos diluidos en ACN adicionando la alícuota correspondiente. Una vez separado el medio líquido de la biomasa, el medio líquido se fortificó con el estándar de la mezcla de los metabolitos antes de verterlo al cartucho de extracción. Para la biomasa, esta se fortificó con la alícuota correspondiente cuando se encontraba en el mortero de ágata y se esperó a que se evaporara el disolvente aproximadamente 10min, antes de agregar la sílice C18 para su homogenización.

#### 3.3.6.1 Linealidad

La linealidad se realizó con 6 niveles de concentración, como se muestra en la **Tabla 7**. Cada nivel se realizó por triplicado, fortificando el medio líquido sin microalgas antes de verter al cartucho de EFS y fortificando la biomasa antes de agregar la sílice para la DMFS, ambas muestras provenientes de microalgas inmovilizadas.

**Tabla 7.** Concentraciones de fortificación en muestra líquida y biomasa.

Analito	EFS- HPLC-FD <sup>a</sup>			DMFS- HPLC-FD <sup>b</sup>		
	5,6-dBaA	8,9-dBaA	10,11-dBaA	5,6-dBaA	8,9-dBaA	10,11-dBaA
Nivel	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mg	ng/mg	ng/mg
1	0.67	1.33	1.33	0.96	1.92	1.92
2	1.33	2.67	2.67	1.92	3.85	3.85
3	2.67	5.33	5.33	3.85	7.69	7.69
4	5.07	10.13	10.13	7.31	14.62	14.62
5	10.00	20.00	20.00	14.62	29.23	29.23
6	100.00	200.00	200.00	144.23	288.46	288.46

<sup>a</sup>Concentraciones en la muestra de 15.0 mL de medio líquido, <sup>b</sup>Concentraciones en biomasa de 5.2±0.4 mg.

### 3.3.6.2 Precisión

La precisión de ambas metodologías se evaluó con el cálculo de %CV de la repetibilidad y reproducibilidad de la muestra fortificada a la concentración indicada en la **Tabla 7** como nivel 5. Para la repetibilidad se inyectó la Fracción A tres veces en un mismo día y en tres días diferentes por triplicado para la reproducibilidad.

### 3.3.6.3 Límites de cuantificación y detección

La evaluación de los límites de cuantificación y detección se realizó por tratamiento con las **Ecuaciones 3** y **4**, utilizándolas concentraciones indicadas en los niveles 1, 2 y 3 de la **Tabla 7** para cada método y cada dBaA.

### 3.3.6.4 Repetibilidad de los métodos de extracción con el parámetro % recobro

La evaluación de la repetibilidad en la extracción de los metabolitos se hizo en tres niveles de concentración y con la metodología descrita en los apartados 3.3.4.2 y 3.3.4.3. Para cada microalga y cada nivel de concentración, se realizó por triplicado el análisis de los extractos obtenidos tanto de EFS como DMFS. La fortificación de las muestras líquidas y biomasa se muestra en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Concentraciones fortificadas para la repetibilidad de la metodología para dBaA. Concentraciones indicadas como ng/mL de cultivo y ng/mg de biomasa para EFS y DMFS, respectivamente.

Metodología	Analito	Concentración		
		Nivel 4	Nivel 5	Nivel 6
EFS	5,6-dBaA	5.07	10.00	100.00
	8,9-dBaA	10.13	20.00	200.00
	10,11-dBaA	10.13	20.00	200.00
DMFS	5,6-dBaA	7.31	14.62	144.23
	8,9-dBaA	14.62	29.23	288.46
	10,11-dBaA	14.62	29.23	288.46

### 3.3.6.5 Prueba estadística entre microalgas

Se puede utilizar la *t* de Student para decidir si dos conjuntos de medidas replicadas dan resultado “igual” o “diferente”, a un nivel de confianza dado. La  $t_{calculada}$  de la **Ecuación 5** se compara con la  $t_{tablas}$  para  $n_1+n_2-2$  grados de libertad (Harris, 2001). La prueba se realizó empleando cultivos de las microalgas *S. capricornutum* y *S. acutus* inmovilizadas, fortificando a una sola concentración para medio líquido (10, 20, 20 ng/mL para 5,6-, 8,9-, y 10,11-dBaA respectivamente) y biomasa (14.62, 29.23, 29.23 ng/mg para 5,6-, 8,9-, 10,11-dBaA respectivamente), siguiendo la metodología de los apartados 3.3.4.2 y 3.3.4.3 para el tratamiento de cada una. El cálculo se realizó con la prueba estadística de comparación de medias utilizando la *t* de Student, caso: comparación de medidas replicadas, usando las **Ecuaciones 5 y 6**.

$$t_{calculada} = \frac{x_1 - x_2}{s_{combinada}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \dots\dots\dots (Ecuación 5)$$

$$s_{combinada} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1-1) + s_2^2(n_2-1)}{n_1 + n_2 - 2}} \dots\dots\dots (Ecuación 6)$$

Donde *s* es la desviación estándar, *n* es el número de datos utilizados, *x* el promedio de las medidas.

### 3.3.7 Aplicación de la metodología analítica

#### 3.3.7.1 Bioensayos (ensayos de exposición del BaA a las microalgas)

Para efectuar los bioensayos de exposición se usaron cultivos de *S. capricornutum* y *S. acutus* con absorbancia uno y las células se inmovilizaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.3.3.2. Cada tiempo de exposición como se muestra en la **Tabla 9**, se realizó por triplicado y con su respectivo blanco consistente de medio de cultivo con perlas de microalgas sin fortificar. Se fortificó el medio con 266 µg/mL. Para efectos de comparación se manejaron bioensayos con cultivos de microalgas libres con *S. capricornutum* a 6 h de incubación.

**Tabla 9.** Tiempos de bioensayos para las microalgas inmovilizadas y libres

Microalga	Cultivo	Tiempo de exposición (horas)					
<i>S. capricornutum</i>	Inmovilizado	3	6	12	24	48	
<i>S. acutus</i>	Inmovilizado	6	12	24	48	72	96
<i>S. capricornutum</i>	Libre	6					

Tanto para las microalgas libres como para las microalgas inmovilizadas, dentro de la campana de flujo laminar se fortificó cada cultivo para bioensayo con una alícuota de 215  $\mu\text{L}$  de una disolución estándar de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BaA disuelto en ACN (4.3  $\mu\text{g}$ ), a partir de ese momento se comenzó a contar el tiempo de exposición. Los cultivos fortificados se mantuvieron bajo condiciones de agitación constante a 100 rpm, en presencia de luz amarilla y a temperatura de 25°C durante todo el tiempo de exposición. Una vez cumplido su tiempo se retiraron del agitador y se trataron como se describe en el apartado 3.3.3.3 para desinmovilizarlas y obtener las muestras de interés separando el medio líquido de la biomasa algal.

### 3.3.7.2 Condición de análisis de metabolitos formados y BaA

La extracción de los analitos del medio líquido se hizo mediante la metodología de EFS descrita en el apartado 3.3.4.2 y de la biomasa con la metodología de DMFS descrita en el apartado 3.3.4.3. Las condiciones de análisis cromatográfico de los extractos se muestran en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Condiciones de análisis para extractos de bioensayos por HPLC.

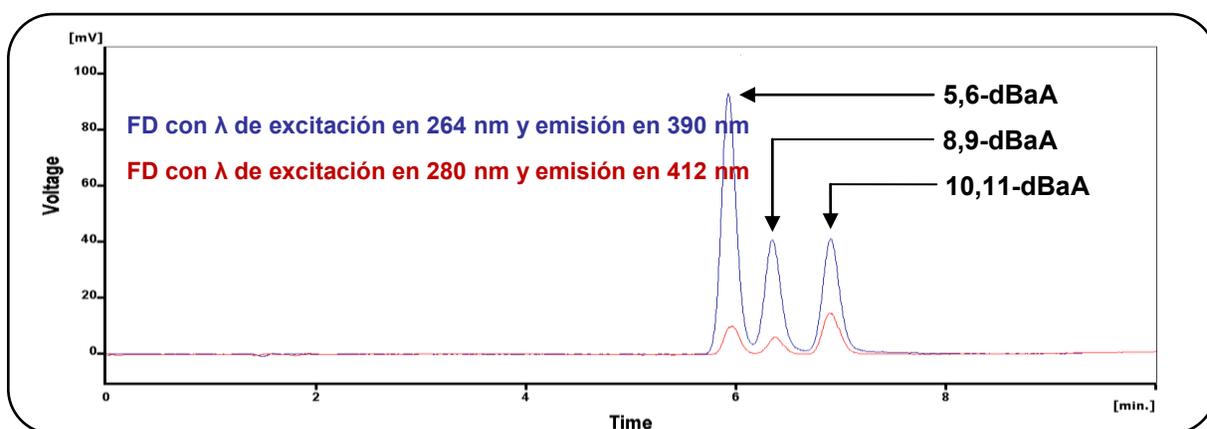
<b>Analito</b>	<b>dBaA(s)</b>	<b>BaA</b>
<b>Columna cromatográfica</b>	Agilent Eclipse XDB-C18 de 4.6x150 mm, 3.5 $\mu\text{m}$ dp, acondicionada con 30 mL de fase móvil	
<b>Fase móvil</b>	metanol:agua 65:35% v/v	metanol 100% v/v
<b>Flujo y Temperatura</b>	1 mL/min y 30°C	
<b>Volumen de inyección</b>	20 $\mu\text{L}$	
<b>Sistema de Detección</b>	Fluorescencia	Ultra Violeta
<b><math>\lambda</math> de detección (nm)</b>	emisión 264 y excitación 390	286
<b>Análisis</b>	Cuantitativo	Cualitativo

## IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 4.1 Optimización de las condiciones de separación y detección

#### 4.1.1 Selección de longitudes de onda óptimas para cada metabolito

Con la inyección individual de los tres metabolitos del BaA se observó el tiempo en el que se retiene cada uno en la columna Agilent Eclipse XDB-C18 4.6x150 mm y 5  $\mu$ m dp, con fase móvil 70:30% v/v MeOH:H<sub>2</sub>O, los resultados concuerdan con los presentados por Hernández Camarillo, 2015. El orden de elución fue el siguiente: 5,6-dBaA, 8,9-dBaA y 10,11-dBaA, ver **Figura 16**.



**Figura 16.** Optimización de las condiciones de detección. Cromatograma de una solución estándar de metabolitos en MeOH:H<sub>2</sub>O 55:45% v/v. Concentraciones mostradas en Tabla 11. Condiciones de análisis: columna Agilent Eclipse XDB-C18 4.6x150 mm y 5  $\mu$ m dp, fase móvil MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30% v/v, flujo 1 mL/min, temperatura 30°C.

En la **Tabla 11** se muestran los datos cromatográficos correspondientes a de los metabolitos del BaA. El valor de  $t_0 = 1.36$  min.

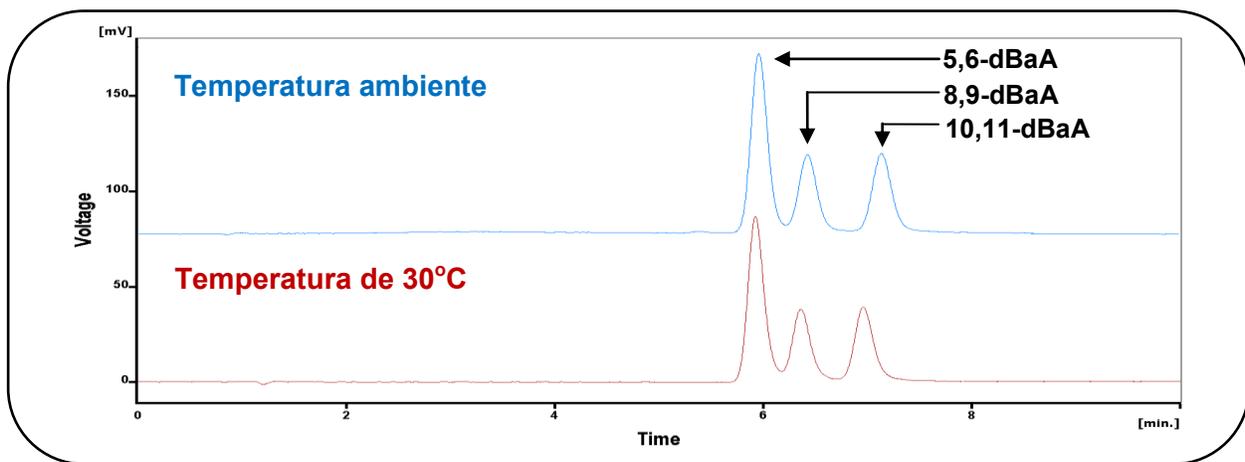
**Tabla 11.** Parámetros cromatográficos de los metabolitos del BaA en FD con FM MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30% v/v.

Compuesto dBaA	5,6-	8,9-	10,11-
Concentración (ng/mL)	100	100	103
$t_r$ (min)	5.924	6.344	6.900
Área (mV.s)	927.993	449.277	461.569
Altura (mV)	92.759	40.383	40.377
W1/2 (min)	0.16	0.17	0.18
Asimetría (-)	1.242	1.125	1.154
Factor de capacidad ( $k'$ )	3.355	3.664	4.073
Número platos teóricos por metro (N)	50675.7	51480.0	54320.4
Resolución ( $R_s$ )	1.272		1.588
Factor de selectividad ( $\alpha$ )	1.092		1.111

Dado que la separación es aceptable visualmente empleando estas condiciones de análisis, se decidió encontrar las condiciones de detección por fluorescencia específicas para los metabolitos del BaA. Por lo tanto se realizaron los espectros de emisión y excitación correspondientes a cada analito, los cuales se muestran en el apartado 7.2. Encontrándose que a 390 nm la longitud de onda de emisión es más adecuada, ya que así se está en los máximos de fluorescencia para los metabolitos 8,9- y 10,11-dBaA; que se cree se forman en menor cantidad que el 5,6-dBaA (García Cicourel, 2015), aunque para este último se está, a esa longitud, por arriba de la mitad de su máximo de emisión. Tratar de colocarse en la detección máxima para el 5,6-dBaA no es ventajoso (370 nm), ya que éste estará en presencia de los otros dos analitos, los cuales verán disminuida su detección. Aunque el metabolito 5,6- no se encuentra en su longitud de onda de máxima emisión, tiene una muy buena respuesta en esta condición. En lo que respecta a la longitud de onda de excitación, se seleccionó 264 nm con la ideal de estar casi en los máximos de fluorescencia de los metabolitos 8,9- y 10,11-dBaA y no tan alejados del máximo correspondiente al 5,6-dBaA (244 nm).

#### 4.1.2 Selección de la temperatura

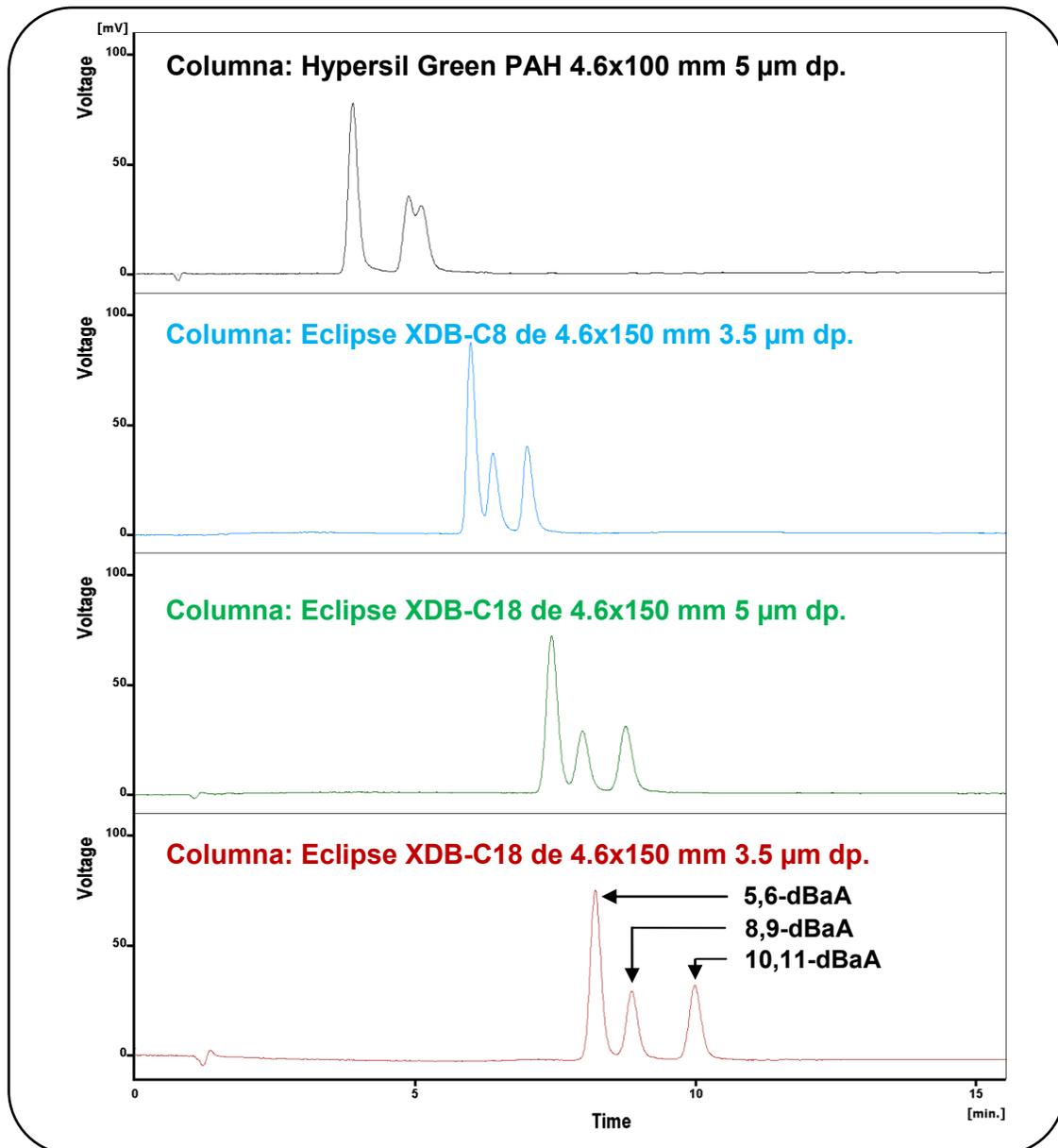
Respecto a la selección de la temperatura (ver **Figura 17**) se observa que a mayor temperatura se obtienen tiempos de retención menores y el ancho de los picos disminuye, por lo que la apariencia de éstos mejora. Se eligió una temperatura de análisis de 30°C como mejor opción, ya que así se evita la variabilidad que habría con la temperatura ambiente (24±4°C) en la corrida de análisis. Cabe aclarar que se probó la temperatura de 35°C y efectivamente se mantiene la separación de los metabolitos, el ancho de los picos es más estrecho, sin embargo al aumentar la temperatura en la columna, se está disminuyendo su vida útil y hay un mayor desgaste, la recomendación del fabricante es usarla a no más de 40°C.



**Figura 17.** Cromatogramas del efecto de la temperatura. Las soluciones estándar de metabolitos están en ACN:H<sub>2</sub>O 55:45% v/v. Concentraciones mostradas en Tabla 11. Condiciones de análisis: columna Agilent Eclipse XDB-C18 4.6x150 mm y 5 µm dp, fase móvil MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30% v/v, flujo 1 mL/min.

### 4.1.3 Selección de fase estacionaria

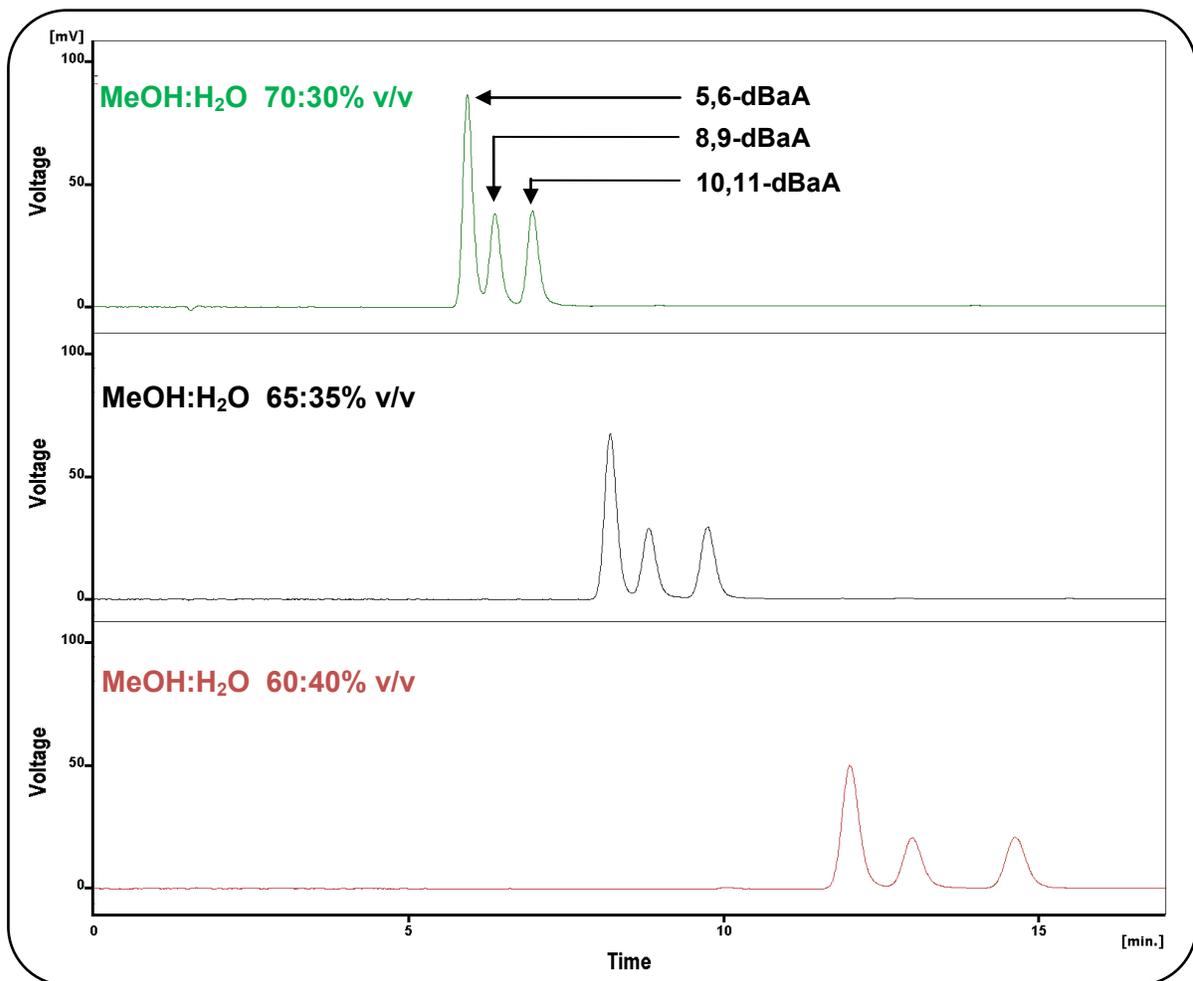
Siguiendo con la optimización de las condiciones de separación, en la **Figura 18** se muestran las diferentes columnas disponibles en el laboratorio, las cuales fueron probadas para la separación de los metabolitos del BaA. Se observa una mayor resolución de los picos correspondientes a 5,6- y 8,9-dBaA con la columna XDB-C18 de 4.6x150 mm 3.5  $\mu$ m dp, además de picos muy bien definidos. Se consideró que esta última columna es la ideal para el análisis de los metabolitos.



**Figura 18.** Cromatogramas con las diferentes fases estacionarias probadas para la separación de los metabolitos. Las soluciones estándar de metabolitos están en 55:45% v/v ACN:H<sub>2</sub>O, concentraciones mostradas en Tabla 11. Condiciones de análisis: Flujo 1 mL/min, FD con 280 nm excitación y 412 nm emisión, 30°C, fase móvil MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35% v/v.

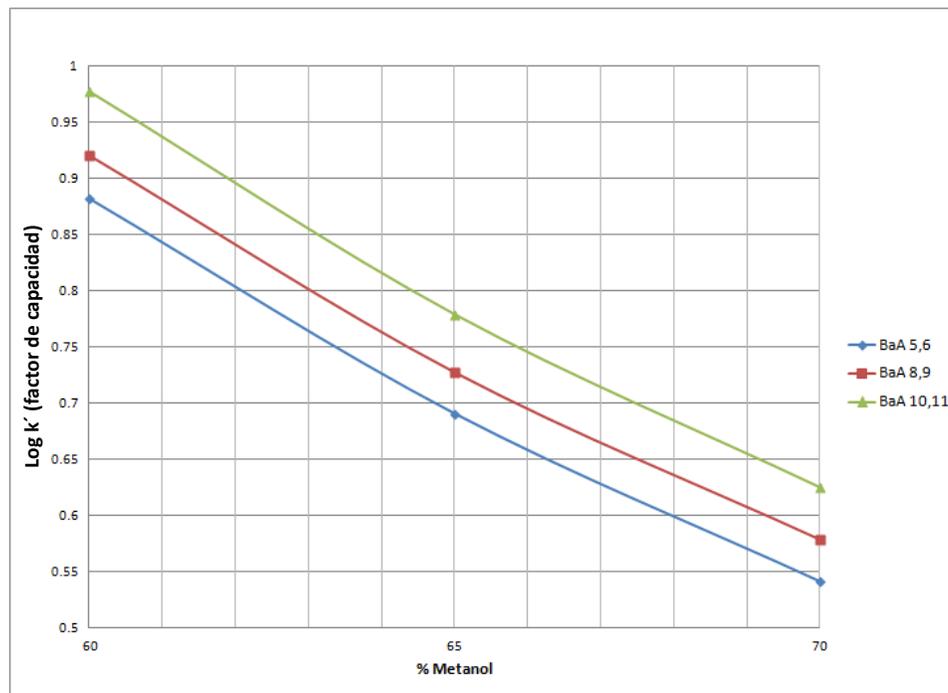
#### 4.1.4 Selección de la fase móvil para la separación

Por otra parte se obtuvieron los siguientes perfiles mostrados en la **Figura 19** para las diferentes fases móviles probadas. Se observa que a menor porcentaje de metanol usado, los tiempos de retención son más largos, debido al aumento de la polaridad en la fase móvil cuando los metabolitos son no polares, éstos se van eluyendo más lentamente, por lo que la altura de los picos disminuye y el ancho de los mismos aumenta. Se observa que con una fase móvil de mayor polaridad como la de MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40% v/v, se obtiene una mejor resolución de los picos correspondientes para el 5,6- y 8,9-dBaA sin embargo la respuesta de los solutos es más pequeña, lo que afecta directamente la sensibilidad de la metodología. La fase de menor polaridad MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30% es buena ya que se obtienen picos más altos, más estrechos y en un menor tiempo de corrida, sin embargo no hay óptima resolución entre el primero y el segundo pico.



**Figura 19.** Cromatogramas del efecto de la fase móvil en la retención de los metabolitos. Las soluciones estándar de metabolitos están en ACN:H<sub>2</sub>O 55:45% v/v. Concentraciones mostradas en **Tabla 11**. Condiciones de análisis: columna Agilent Eclipse XDB-C18 4.6x150 mm y 3.5 µm dp., flujo 1 mL/min, FD con 280 nm excitación y 412 nm emisión.

Para la elección de la fase móvil para el análisis de los metabolitos del BaA, se tomó en cuenta también el  $t_r$ , obtenido con la variación de su composición. En la **Figura 20** se muestran los valores de  $\log k'$  para los metabolitos en tres diferentes fases móviles. Como se puede observar se tiene tendencia de rectas paralelas y cercanas para las correspondientes de 5,6- y 8,9-dBaA, lo que indica la dificultad para separarlos satisfactoriamente. Mientras más agua tiene la fase móvil, más se logra separar estos dos picos; aumentando la polaridad de la fase móvil el tiempo de análisis o corrida va aumentando así como los efectos en los picos mencionados anteriormente. Emplear un análisis con fase móvil menor de 55% MeOH implicaría tiempos de corrida alrededor de los 30 min y a 50% MeOH los  $t_r$  están después de los 45 min, lo que para un análisis de 15 muestras (resultado del triplicado de cinco tiempos de bioensayo para una microalga) no es práctico. Por lo tanto, se eligió la fase móvil de 65% MeOH como la más adecuada.



**Figura 20.** Gráfica de variación del logaritmo del factor de capacidad ( $\text{Log } k'$ ) de los metabolitos del BaA en función del contenido de metanol en la fase móvil.

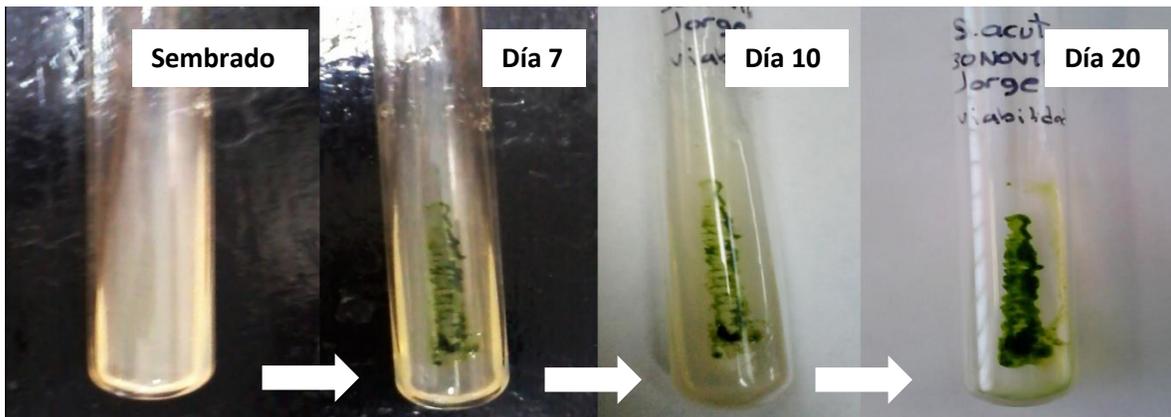
## 4.2 Inmovilización de microalgas

### 4.2.1 Viabilidad de microalgas inmovilizadas

Para comprobar que las microalgas seguían vivas después de permanecer inmovilizadas por 72 h en alginato de sodio y suspendidas en Medio Bristol, se desinmovilizaron como se ilustra en la **Figura 12**. Y se volvieron a resembrar en un tubo de medio sólido. En su monitoreo

durante 20 días, se observó un crecimiento favorable de la microalga sembrada en el medio sólido, como se muestra en la **Figura 21**.

Por lo tanto, con este experimento se demuestra que durante la inmovilización las microalgas no sufren daño alguno que imposibilite su reproducción y permanecen vivas después de estar 72 h inmovilizadas. Sin embargo esto no significa que con las condiciones de inmovilización establecidas la microalga no resista más tiempo inmovilizada (Bernal Toris, 2015). El haber obtenido resultados favorables (ver más adelante) en bioensayos de 96 h, podría ser un indicativo de que a un mayor tiempo de inmovilización de las células, éstas permanecen vivas; aunque debe de existir un límite, que no se determinó por no ser necesario para los fines de este trabajo.



**Figura 21.** Crecimiento de las microalgas después de haber permanecido inmovilizadas por 72 h. La observación del crecimiento después de haber sido sembrado el medio sólido fue de 20 días. A partir del día 7 se notó un crecimiento favorable.

Así, también su viabilidad fue confirmada por León Santiago, 2016; que después de un mes de haberlas inmovilizado observó un aumento en la intensidad de coloración en las perlas con microalgas y su forma celular al microscopio sin cambios drásticos en color y forma, comparando con un cultivo fresco de microalgas libres. Por otro lado Bernal Toris, 2015; midió la biomasa y obtuvo mayor cantidad después de 24 h inmovilizada. Ruiz-Marín et al, 2011; inmovilizó la microalga *S. obliquus* en cuentas de alginato de calcio y observó que el número de microalgas por cuenta aumenta gradualmente con el tiempo y sugiere que después de la inmovilización, la microalga todavía fue capaz de experimentar división celular y llevar a cabo fotosíntesis.

#### 4.3 Optimización de los métodos de extracción por, EFS y DMFS

Se comenzó la metodología descrita para la extracción de los analitos en cartuchos, reportada por García Cicourel, 2015; la cual es detallada en la **Figura 22** para muestras de medio líquido y biomasa. Con la concentración de 10, 20, 20 ng/mL para medio de cultivo

líquido y 14.62, 29.23, 29.23 ng/mg para biomasa de los metabolitos 5,6-, 8,9- y 10,11-dBaA respectivamente. Se obtuvieron los porcentajes de recobro mostrados en la **Tabla 12**. Al observar que éstos estaban por debajo del 70%, se decidió analizar el efluente de la EFS y recuperar y analizar las fracciones de lavado con mezclas ACN:H<sub>2</sub>O en diferentes proporciones y elución de los metabolitos. Lo anterior con el fin de observar si había fugas de los metabolitos.

Orden descendente	EFS		DMFS	
	García C., 2015	Este trabajo	García C., 2015	Este trabajo
	<i>Lavados empleando vacío</i>	<i>Lavados a gravedad</i>	<i>Lavados empleando vacío</i>	<i>Lavados a gravedad</i>
10 mL H <sub>2</sub> O	10 mL H <sub>2</sub> O	10 mL H <sub>2</sub> O	5 mL H <sub>2</sub> O	
10 mL ACN:H <sub>2</sub> O 10:90% v/v		10 mL ACN:H <sub>2</sub> O 10:90% v/v		
3 mL ACN:H <sub>2</sub> O 20:80% v/v		5 mL ACN:H <sub>2</sub> O 20:80% v/v		
1 mL ACN:H <sub>2</sub> O 30:70% v/v	1 mL ACN:H <sub>2</sub> O 30:70% v/v			
<i>Elución por gravedad</i>	<i>Elución por gravedad</i>	<i>Elución por gravedad</i>	<i>Elución por gravedad</i>	
(Fracción A - metabolitos)				
3 mL ACN:H <sub>2</sub> O 55:45% v/v	3 mL ACN:H <sub>2</sub> O 55:45% v/v	1.5 mL ACN:H <sub>2</sub> O 40:60% v/v	1.5 mL ACN:H <sub>2</sub> O 55:45% v/v	
(Fracción B - HAP)				
3 mL ACN 100%	3 mL ACN 100%	1 mL ACN 100%	1 mL ACN 100%	

**Figura 22.** Metodología descrita por García Cicourel, 2015; para la extracción off-line de los metabolitos del BaA comparada con la del presente trabajo. El orden del proceso es de arriba hacia abajo.

**Tabla 12.** Porcentaje de recuperación de metabolitos empleando la EFS y DMFS.

	Fracción	Analito y %Recobro		
		5,6-dBaA	8,9-dBaA	10,11-dBaA
EFS	10 mL ACN:H <sub>2</sub> O 10:90% v/v	2	2	3
	3 mL ACN:H <sub>2</sub> O 20:80% v/v	5	3	2
	1 mL ACN:H <sub>2</sub> O 30:70% v/v	6	4	3
	“A” (3 mL ACN:H <sub>2</sub> O 55:45% v/v)	54	69	70
DMFS	10 mL ACN:H <sub>2</sub> O 10:90% v/v	7	5	4
	5 mL ACN:H <sub>2</sub> O 20:80% v/v	12	12	13
	“A” (1.5 mL ACN:H <sub>2</sub> O 40:60% v/v)	29	37	38

Como se observa en la **Tabla 12**, desde el momento en el que se carga la muestra al cartucho EFS, se tienen pequeñas fugas de los analitos y esto continúa mediante los lavados para quitar impurezas, teniéndose porcentajes de recobro muy bajos. Para la metodología de EFS, antes de recolectar la Fracción A que es la de interés, hay una pérdida total de 27, 11 y 11% para el 5,6-, 8,9- y 10,11-dBaA respectivamente. Sumándole el porcentaje de recobro obtenido de la Fracción A, que es el extracto, más el perdido en los lavados se tendría una recuperación global del 81.1, 80 y 81.1%, porcentajes más aceptables. Los valores de la **Tabla 12** también muestran que la pérdida en DMFS (19%, 17% y 17% en el orden de elución de los metabolitos) es parecida a la de EFS, sin embargo los porcentajes de recuperación en la Fracción A que es el extracto, estaban muy bajos (48%, 54% y 55% en el orden de elución de los metabolitos).

Se hicieron las modificaciones a la metodología original, las cuales también son mostradas en la **Figura 22**, para mejorar los porcentajes de recuperación. Finalmente la metodología optimizada en este trabajo es la que se empleó para la validación y extracción de los metabolitos en las muestras de bioensayos. Se aumentó así el porcentaje de recuperación en la fracción de interés como se muestra en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Porcentaje de recobro obtenido con metodología optimizada para metabolitos

Metodología	Fracción	Analitos y % Recobro		
		5,6-dBaA	8,9-dBaA	10,11-dBaA
EFS	"A" (3 mL ACN:H <sub>2</sub> O 55:45%v/v)	92	94	94
	1 mL ACN 55% después de "A"	0.2	0.2	0.3
DMFS	"A" (1.5 mL ACN:H <sub>2</sub> O 40:60%v/v)	92	82	84
	"A" (1.5 mL ACN:H <sub>2</sub> O 55:45%v/v)	101	102	104

Considerando los resultados de la **Tabla 13**, se mejoraron los recobros de la Fracción A mostrados en las **Tablas 12**. En el método de EFS se obtuvo una mejora en cuanto al porcentaje de recuperación para los metabolitos, en este caso se decidió recolectar la fracción de interés con 3 mL y no con 4 mL ya que se observó un recobro aceptable y adicionar 1 mL más, se obtiene poca ganancia en porcentaje y conduciría a tener una muestra de mayor volumen y los analitos más diluidos. Para la metodología de DMFS se escogió la proporción de eluente de ACN:H<sub>2</sub>O 55:45% v/v para recolectar la Fracción A en 1.5 mL, de esta forma se asegura la elución completa de todos los metabolitos presentes en la muestra. Aun cuando se mejoraron los recobros, el solvente con 55% en ACN provocó que cerca de un 28% de BaA para n=3 se recolectara en la Fracción A. No es conveniente que se co-eluya con los metabolitos dado que pudiera presentar una concentración comparativamente mucho más alta que los metabolitos en algunos de los extractos. Además su *tr* es mucho mayor que la de los dBaA con la fase móvil usada. Por lo tanto se realizó el estudio para observar si el BaA presente en la Fracción A provocaba problemas de respuesta muy alta durante la corrida de análisis de los metabolitos. Se midieron los tiempos de retención y áreas del conjunto BaA y sus metabolitos con disoluciones de concentración indicada en la **Tabla 14**.

**Tabla 14.** Características del análisis de metabolitos y BaA, soluciones individuales.

Estándar	<i>tr</i> (min)	Área (mV.s)	Concentración (ng/mL)	Cantidad (ng)
5,6-dBaA	7.792	1268.000	76.0	144.0
8,9-dBaA	8.388	1144.673	152.0	228.0
10,11-dBaA	9.252	1165.324	152.0	288.0
BaA	129.840	4722.449	303	303.0

De acuerdo a los resultados de la **Tabla 14**, el BaA no satura la celda del detector y no interfiere durante la corrida de análisis de los metabolitos. Sin embargo, el BaA sale en un tiempo de retención de 129.84 min, con la fase móvil utilizada de MeOH:H<sub>2</sub>O 65:35% v/v; éste siendo mucho mayor que el de los metabolitos, como era de esperarse. El pico correspondiente al BaA está poco definido, se observa como si fuera una panza de la línea base que comienza desde el minuto 126.032 y termina en 137.24 min. El tiempo de corrida de los metabolitos es de aproximadamente 10 min, de acuerdo a cálculos se pueden inyectar 12 muestras continuas de la Fracción A, sin que interfiera la presencia del BaA. Después de la doceava muestra, es conveniente cambiar a una fase móvil de 100% MeOH para lavar el sistema cromatográfico y que de esta forma salga a desechos todo el BaA que está retenido en la columna cromatográfica.

#### 4.4 Validación del sistema cromatográfico

Los resultados obtenidos para la validación del sistema cromatográfico se muestran en la **Tabla 15**. El sistema presentó buena linealidad con coeficientes de correlación ( $r^2$ ) mayores a 0.998 para todos los analitos en el intervalo de trabajo, en este caso de 2.5 a 500 ng/mL para 5,6-dBaA y de 5 a 1000 ng/mL para 8,9-; 10,11-dBaA. La precisión del sistema resultó también buena con CV menores al 4.05% ya que en la literatura se reporta CV aceptable máximo del 5% empleando estándares, para poder decir que el método es repetible en un mismo día y reproducible en varios días (Murillo, 2012). La presencia de los anillos aromáticos en la estructura de los HAPs permite alcanzar límites de detección hasta 1.747 ng/mL y cuantificación del orden de los 5.293 ng/mL para el 5,6-dBaA, utilizando el detector de fluorescencia. Como se puede observar en las curvas de calibración, mostradas en el apartado 7.3, hay muy poca dispersión de los datos en toda la curva, la principal variación se debe a la respuesta del equipo. Los gráficos de linealidad y límites se presentan en el apartado 7.3.

**Tabla 15.** Resultados de validación del sistema cromatográfico para los dBaA.

Analito	Linealidad ( $r^2$ )	LDT <sup>a</sup> (ng/mL)	LDE <sup>b</sup> (ng/mL)	LCT <sup>a</sup> (ng/mL)	LCE <sup>b</sup> (ng /mL)	Precisión(%CV)			
						Repetibilidad		Reproducibilidad	
						Nivel 1	Nivel 2	Nivel 1	Nivel 2
5,6-dBaA	0.9992	1.747	0.75	5.293	2.5	0.20	0.15	3.73	0.89
8,9-dBaA	0.9991	2.930	1.50	8.878	5.0	1.50	0.27	1.80	1.35
10,11-dBaA	0.9988	2.796	1.50	8.474	5.0	1.47	0.11	2.45	4.05

Nivel 1 de concentración: 5, 10, 10 ng/mL para 5,6-; 8,9-; 10,11-dBaA. Nivel 2 de concentración: 50, 100, 100 ng/mL para 5,6-; 8,9-; 10,11-dBaA. <sup>a</sup>Calculado en base a la desviación y la pendiente de la curva de calibración. <sup>b</sup>Calculado como 3 veces la señal/ruido para LD y 10 veces señal/ruido para LC.

Es apreciable que para los tres metabolitos del BaA los *LDT* y *LCT* calculados con la curva de calibración son mayores que los obtenidos experimentalmente (ver **Tabla 15**). En términos generales, el límite de detección de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. El límite de cuantificación es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas y veracidad aceptables, como opuesto a la detección cualitativa (Miller & Miller, 2002).

#### 4.5 Validación de la metodología para los cultivos de las microalgas inmovilizadas

La metodología de EFS-HPLC-FD y DMFS-HPLC-FD empleada para la determinación de los metabolitos del BaA producidos por microalgas inmovilizadas resultó ser lineal para el intervalo de concentraciones evaluadas, datos mostrados en **Tabla 16**. Los coeficientes de correlación obtenidos por el método de mínimos cuadrados fueron de 0.999 por lo que los datos experimentales se ajustan a una línea recta que relaciona ambas variables.

**Tabla 16.** Parámetros obtenidos de la linealidad del método empleado para los metabolitos del BaA, obtenidos a partir de un gráfico de respuesta vs concentración.

Método	Analito	Intervalo de concentración	Pendiente (mV.s/)	Ordenada al origen (mV.s)	r <sup>2</sup>
EFS-HPLC-FD	5,6-dBaA	0.67–100.00 <sup>a</sup>	79.68 <sup>a</sup>	115.9	0.999
	8,9-dBaA	1.33– 200.00 <sup>a</sup>	36.75 <sup>a</sup>	97.80	0.999
	10,11-dBaA	1.33 – 200.00 <sup>a</sup>	39.21 <sup>a</sup>	89.57	0.999
DMFS-HPLC-FD	5,6-dBaA	0.96 – 144.23 <sup>b</sup>	57.35 <sup>b</sup>	61.75	0.999
	8,9-dBaA	1.92 – 288.46 <sup>b</sup>	26.32 <sup>b</sup>	52.51	0.999
	10,11-dBaA	1.92 – 288.46 <sup>b</sup>	27.43 <sup>b</sup>	55.60	0.999

<sup>a</sup>ng/mL de medio, <sup>b</sup>ng/mg de biomasa.

Como parte de la validación se reportan en la **Tabla 17** los valores obtenidos para los parámetros de límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad y reproducibilidad. Los *LDE* y *LCE* experimentales obtenidos son del mismo orden que los reportados por García Cicourel, 2015; con detección UV y preconcentración en línea de los extractos, para la cuantificación de los metabolitos producidos por la biodegradación del BaA. El presente método es más simple ya que no requiere de la preconcentración en línea gracias a la alta sensibilidad del detector fluorométrico. Por la misma razón pudo ser simplificada la metodología de extracción EFS y DMFS. Como se puede observar los %CV para la precisión de la metodología son aceptables, ya que todos son menores a 2.3%, por lo que se demuestra que la metodología de análisis es repetible. Los gráficos de linealidad y límites se presentan en el apartado 7.4.

**Tabla 17.** Parámetros para la validación de la metodología de EFS y DMFS para el análisis de los metabolitos del BaA.

Metodología	Analito	LDT (ng/mL)	LDE (ng/mL)	LCT (ng/mL)	LCE (ng/mL)	Precisión(%CV)	
						Repetibilidad	Reproducibilidad
EFS-HPLC-FD	5,6-dBaA	0.29	0.22	0.88	0.66	0.538	1.462
	8,9-dBaA	0.78	0.44	2.37	1.33	0.166	1.749
	10,11-dBaA	0.84	0.44	2.55	1.33	0.950	2.533
DMFS-HPLC-FD	5,6-dBaA	0.103*	0.31*	0.313*	0.96*	0.448	1.390
	8,9-dBaA	0.182*	0.61*	0.550*	1.92*	0.429	2.306
	10,11-dBaA	0.066*	0.61*	0.201*	1.92*	0.887	1.499

\* Unidades de concentración correspondientes a ng/mg de biomasa.

#### 4.5.1 Repetibilidad de la metodología de extracción con el parámetro % recobro

La evaluación de la repetibilidad en la extracción de los metabolitos se hizo con la metodología descrita en los apartados 3.3.4.2 y 3.3.4.3. En la **Tabla 18** se observa que los porcentajes de recuperación obtenidos para los métodos de extracción de dihidrodioles del BaA son muy altos para ambas especies en estado libre con un valor arriba de 90%. Mientras que para las microalgas inmovilizadas la recuperación de los metabolitos está arriba del 81% para *S. acutus* y de 86% para *S. capricornutum* (ver **Tabla 19**). De esta forma se asegura la recuperación cuantitativa de los metabolitos producidos por la biodegradación del BaA en las microalgas, tanto en el medio líquido por EFS y en la biomasa por DMFS. García Cicourel, 2015 reporta recobros máximos del 91% para EFS y 75% en DMFS con *S. capricornutum* libre. Sus recobros son más bajos que los aquí son obtenidos para microalgas libres en la biomasa debido a que él utiliza ACN:H<sub>2</sub>O 40:60% para la recuperación de la fracción de interés en DMFS, la cual no es suficientemente fuerte para desorber a los analitos de la sílice los porcentajes de recuperación están mostrados en la **Tabla 12**.

**Tabla 18.** Porcentajes promedio de recuperación para microalgas libres.

EFS	Nivel	Microalga	%recobro 5,6-dBaA		%recobro 8,9-dBaA		%recobro 10,11-dBaA		DMFS	Nivel	Microalga	%recobro 5,6-dBaA		%recobro 8,9-dBaA		%recobro 10,11-dBaA	
			%	CV	%	CV	%	CV				%	CV	%	CV	%	CV
EFS	4	<i>S. acut</i>	94	2.5	93	1.8	90	2.1	DMFS	4	<i>S. acut</i>	93	7.1	94	6.8	94	7.6
		<i>S. cap</i>	94	5.4	97	4.6	97	4.0			<i>S. cap</i>	99	7.9	92	6.9	92	8.4
	5	<i>S. acut</i>	100	1.0	99	2.3	98	2.6		5	<i>S. acut</i>	97	6.9	96	6.0	96	7.3
		<i>S. cap</i>	98	2.6	100	0.6	100	.08			<i>S. cap</i>	100	3.0	100	3.5	100	3.8
	6	<i>S. acut</i>	98	2.0	98	0.1	97	3.0		6	<i>S. acut</i>	98	0.9	99	0.3	100	1.7
		<i>S. cap</i>	99	0.2	100	1.4	103	0.6			<i>S. cap</i>	97	1.7	97	2.0	96	1.3

Para esta tabla, *Scenedesmus acutus* se abrevia como *S. acut* y *Selenastrum capricornutum* como *S. cap*.

**Tabla 19.** Porcentajes promedio de recuperación para microalgas inmovilizadas.

EFS	Nivel	Microalga	%recobro 5,6-dBaA		%recobro 8,9-dBaA		%recobro 10,11-dBaA		DMFS	Nivel	Microalga	%recobro 5,6-dBaA		%recobro 8,9-dBaA		%recobro 10,11-dBaA	
				CV%		CV%		CV%					CV%		CV%		CV%
EFS	4	<i>S. acut</i>	100	7.4	99	6.4	102	9.7	DMFS	4	<i>S. acut</i>	92	1.3	91	2.2	91	5.0
		<i>S. cap</i>	-	-	-	-	-	-			<i>S. cap</i>	-	-	-	-	-	-
	5	<i>S. acut</i>	103	4.2	101	6.0	101	7.4		5	<i>S. acut</i>	87	7.8	88	7.2	88	7.6
		<i>S. cap</i>	96	5.0	95	6.0	92	6.0			<i>S. cap</i>	89	8.7	86	8.4	87	8.4
	6	<i>S. acut</i>	96	3.8	98	4.6	95	3.0		6	<i>S. acut</i>	81	6.3	82	5.5	83	5.2
		<i>S. cap</i>	-	-	-	-	-	-			<i>S. cap</i>	-	-	-	-	-	-

Para esta tabla, *Scenedesmus acutus* se abreviará como *S. acut* y *Selenastrum capricornutum* como *S. cap*. El símbolo (-) indica que no hay resultados a reportar porque no se utilizó la microalga.

#### 4.5.2 Prueba estadística entre especies de microalgas inmovilizadas para comparar la recuperación de los analitos obtenida con los métodos de extracción, EFS y DMFS.

Para evaluar si existe un efecto en el recobro relacionado con la especie de microalga inmovilizada, se compararon las medias de las cantidades recuperadas de cada metabolito después de procesar las muestras de medio líquido y biomasa por EFS y DMFS, respectivamente mediante una prueba estadística de *t* de Student. Los resultados de esta prueba se muestran en la **Tabla 20**.

**Tabla 20.** Valores de *t* para cada metabolito empleando microalgas inmovilizadas.

Analito (dBaA)	Cantidad adicionada (ng)		Cantidad recuperada (ng)								<i>t</i> calculada		<i>t</i> tablas
	EFS	DMFS	S. <i>capricornutum</i>		S. <i>acutus</i>		S. <i>capricornutum</i>		S. <i>acutus</i>				
			EFS	DE	EFS	DE	DMFS	DE	DMFS	DE			
5,6-	150	76	143.9	7.2	154.6	6.5	67.9	5.9	66.5	5.2	1.913	-0.324	2.776
8,9-	300	152	283.9	17.2	304.8	18.4	131.3	9.7	133.5	9.6	1.435	0.281	
10,11-	300	152	277.4	16.6	302.7	22.6	131.7	9.8	134.1	10.3	1.556	0.296	

Se toma la referencia de que si la  $t_{calculada}$  es mayor que la  $t_{tablas}$  a un nivel de confianza del 95%, los dos resultados se consideran diferentes. En este caso al comparar los valores de *t* y siendo  $t_{tablas} > t_{calculada}$  se concluye que no hay diferencias significativas estadísticamente entre las cantidades recuperadas en el extracto de los metabolitos por ocupar el medio líquido y biomasa de una microalga u otra. La cantidad recuperada de cualquiera de los metabolitos estudiados por una microalga es igual, estadísticamente, a la recuperada empleando la otra microalga. Por lo que es indistinto emplear una microalga u otra, ya que la cantidad recuperada de la extracción para cualquier metabolito ya sea 5,6-, 8,9- o 10,11-dBaA siempre será la

misma. Por lo tanto no fue necesario hacer la validación de la metodología empleando primero una microalga y después la otra.

En la **Tabla 21** se muestran las ecuaciones de la linealidad del método para cada uno de los metabolitos del BaA. La recta ajustada en la curva de cantidad adicionada (ng) vs la cantidad recuperada (ng) nos indica que los recobros globales son mayores a 95% para los metabolitos del BaA, excepto para el 5,6 y 10,11-dBaA en la DMFS para *S. acutus* inmovilizada, donde se tienen valores de 80 y 82% respectivamente.

**Tabla 21.** Linealidad del método de EFS y DMFS para cada uno de los metabolitos.

Microalga	Analito (dBaA)	EFS			DMFS		
		Ecuación lineal	$r^2$	%R <sub>global</sub>	Ecuación lineal	$r^2$	%R <sub>global</sub>
<i>S. capricornutum</i> (libre)	5,6-	$y=0.993x-2.926$	1	99	$y=0.969x+1.264$	1	97
	8,9-	$y=0.998x-2.402$	1	100	$y=0.970x+0.804$	1	97
	10,11-	$y=1.029x-8.419$	1	103	$y=0.955x+2.44$	1	96
<i>S. acutus</i> (libre)	5,6-	$y=0.983x-0.728$	1	98	$y=0.978x-1.637$	1	98
	8,9-	$y=0.982x-2.894$	1	98	$y=0.997x-5.133$	1	100
	10,11-	$y=0.974x-4.910$	1	97	$y=1.010x-6.282$	1	101
<i>S. acutus</i> (inmovilizada)	5,6-	$y=0.950x+7.876$	1	95	$y=0.8x+5.073$	1	80
	8,9-	$y=0.974x+7.500$	1	97	$y=x$	1	100
	10,11-	$y=0.946x+15.31$	1	95	$y=0.820x+8.163$	1	82

Ecuaciones obtenidas de la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados al graficar la cantidad adicionada (ng) vs la cantidad recuperada (ng). Gráficos mostrados en el apartado 7.5.

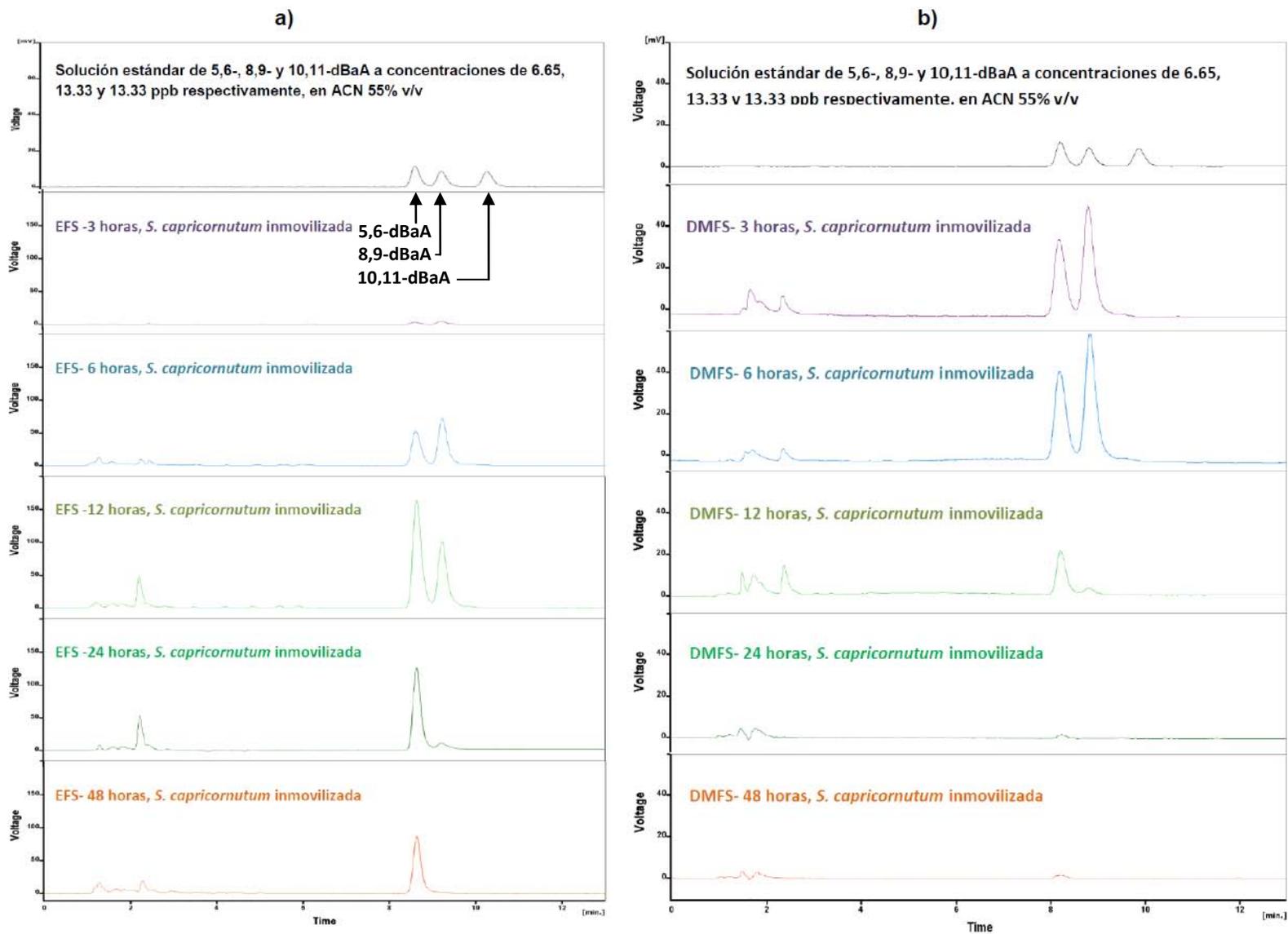
## 4.6 Aplicación de la metodología analítica

### 4.6.1 Bioensayos

#### 4.6.1.1 Monitoreo de los metabolitos

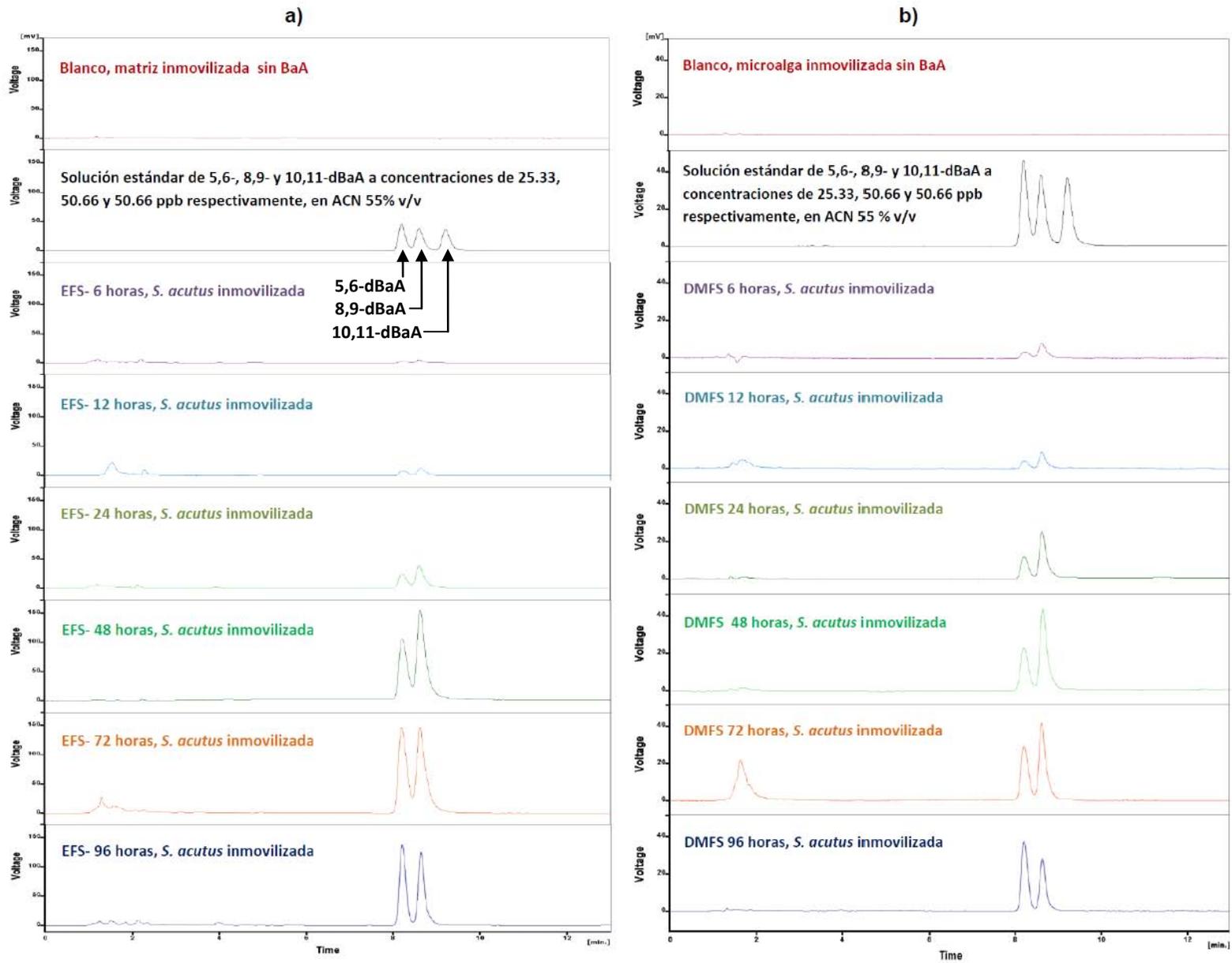
En los extractos provenientes de los ensayos de exposición al BaA se observó la aparición de dos picos cromatográficos de respuesta creciente con respecto al tiempo de exposición, los cuales son correspondientes a los tiempos de retención de los metabolitos *cis*-5,6- y *trans*-8,9-dBaA de acuerdo a la comparación con los *tr* del cromatograma de un estándar.

En las **Figuras 23** y **24** se presentan los cromatogramas obtenidos a los diferentes tiempos de exposición y se evidencia la formación de los metabolitos del BaA por las microalgas *S. capricornutum* y *S. acutus* inmovilizadas. La formación de los metabolitos mencionados fue confirmada en trabajo previo con los espectros de absorción UV correspondientes por García de Llasera y García-Cicourel, 2017, en el caso de las microalgas libres. En el presente trabajo, en ningún caso se observó la presencia de picos cromatográficos diferentes al estándar que fueran indicativos de otro compuesto formado, en las condiciones del estudio.



**Figura 23.** Cromatogramas de bioensayos para *S. capricornutum* inmovilizada. Fortificación a 286.6 ng/mL (4.3 µg) de benzo[a]antraceno en medio de cultivo. a) muestras de medio líquido. b) muestras de biomasa.

En los cromatogramas 23 y 24 se nota la formación en las primeras horas de los dos metabolitos 5,6-dBaA y 8,9-dBaA la señal del 8,9-dBaA es mayor en comparación con la del 5,6-dBaA en ambas microalgas.



**Figura 24.** Cromatogramas de bioensayos para *S. acutus* inmovilizada. Fortificación a 286.6 ng/mL (4.3 µg) de benzo[a]antraceno en medio de cultivo. a) muestras de medio líquido. b) muestras de biomasa.

Se observa que para ambos metabolitos hay una tendencia creciente en su aparición hasta llegar a un máximo y posteriormente comienza a disminuir su señal. Con *S. capricornutum* forma a los metabolitos en biomasa desde las 3 h mientras que en el medio líquido aparecen hasta las 6 h. En el tiempo de 48 h desaparece la señal del 8,9-dBaA mientras que para *S. acutus* a las 96 h de exposición todavía se observan los dos metabolitos, lo que indicaría que para observar un comportamiento de desaparición de los metabolitos se tendrían que monitorear tiempos de bioensayo mayores a 96 h. Una vez formados por la microalga, la disminución de los metabolitos en el medio puede deberse a diversos factores, como una degradación posterior de éstos por agentes del medio o de la atmósfera presentes, la luz o por la misma alga, los cuales deben de estudiarse con más detalle.

Comparando los cromatogramas obtenidos de medio líquido y biomasa para cualquier microalga, se observa que la formación de los metabolitos parece darse en la célula algal, debido a que aparecen primero en la biomasa; el proceso de degradación ocurre inmediatamente y una vez formados los metabolitos, éstos son excretados al medio líquido, observándose así que la detección inicial de los metabolitos se da primeramente en la biomasa y conforme pasa el tiempo va detectándose en el medio líquido como lo reporta García de Llasera et al., 2016 para los metabolitos del BaP. Esto sugiere que la degradación del hidrocarburo es principalmente causada por las enzimas intracelulares y cuando se forman los productos de degradación, se excretan rápidamente al medio (García de Llasera & García-Cicourel, 2017). Respecto a la presencia por primera vez de metabolitos con el tiempo en biomasa, se nota que en el caso de las microalgas libres los forman más rápido que las inmovilizadas, comparando con los resultados de García de Llasera & García-Cicourel, 2017; en microalgas libres donde la presencia de los metabolitos comienza a los 0.75 h de bioensayo mientras que en el presente trabajo con las inmovilizadas a las 3 h. Esto puede deberse a que las células algales al estar rodeadas por una pared de alginato de calcio, tardarían más en recibir el BaA que le toma tiempo difundir a través del polímero hasta entrar en contacto con la microalga, esto tal vez debido al tamaño del poro que forma la red polimérica.

En cuanto al tiempo de aparición de los metabolitos formados es de notarse que hay una diferencia de 3 h al usar *S. capricornutum* y *S. acutus*. Para la primera especie se da más rápido tanto en medio líquido como en biomasa. De la misma manera se ha reportado que *S. acutus* presenta una tasa de formación de metabolitos más lenta que *S. capricornutum* para el caso del benzo[a]pireno (García de Llasera et al., 2016) y lo mismo podría suceder con el benzo[a]antraceno. La rapidez con la que ocurre la degradación del BaA tal vez depende de la cantidad presente de enzimas que se formen y participen en el proceso. La biodegradación de HAPs por microalgas es a menudo específico de la especie y depende de la presencia y la actividad de enzimas (Lei et al., 2007). El contaminante es primero retenido por la célula algal y después de un tiempo, comienza la degradación, este lapso puede depender del tiempo de

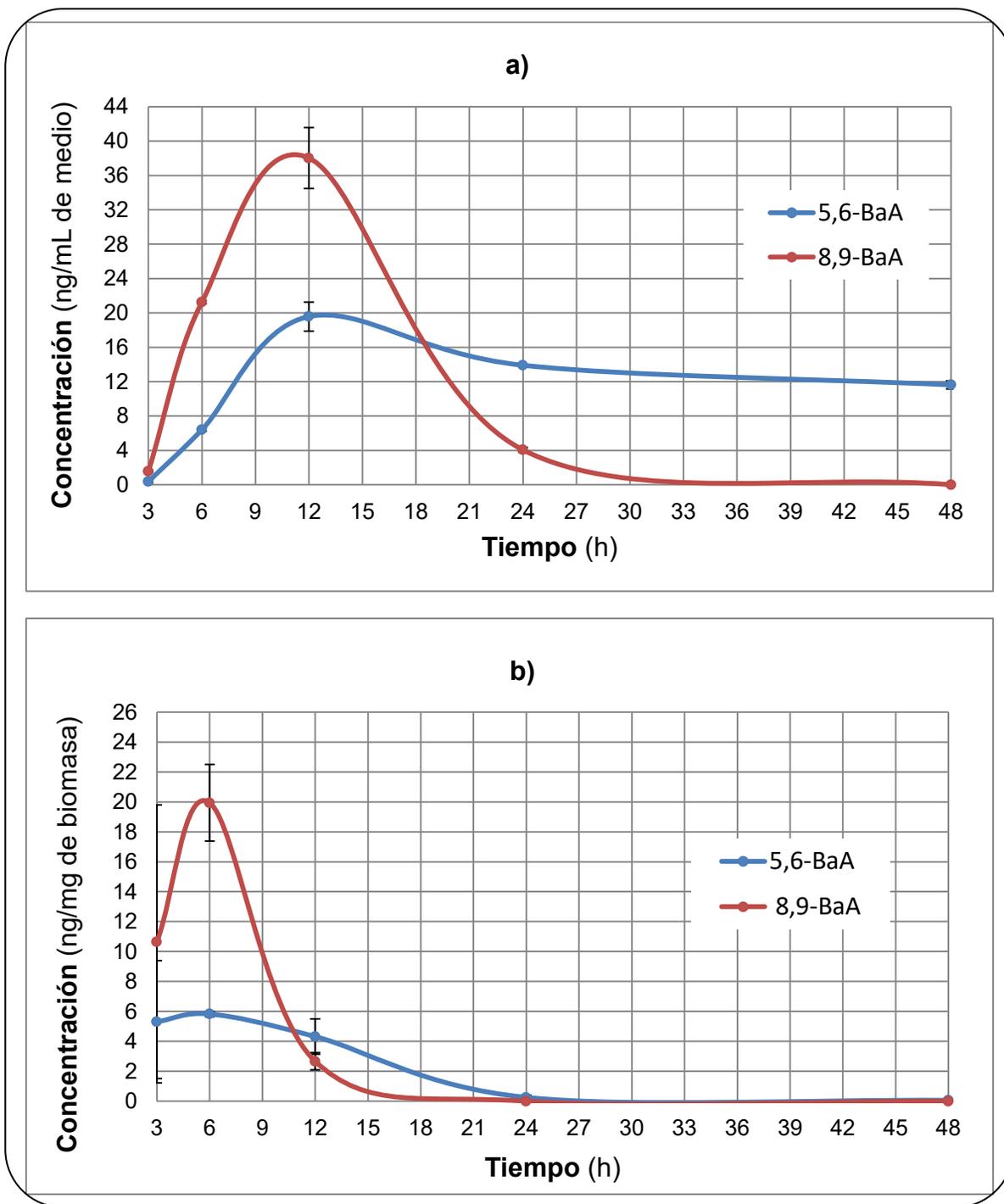
activación de las enzimas (García de Llasera & García-Cicourel, 2017). De esta forma el estudio con las microalgas inmovilizadas nos da a comprender que el proceso de degradación ocurre en el interior de la célula. Sin embargo, aún no existe ningún mecanismo o ruta metabólica descrita a detalle, en la cual basarse para explicar este comportamiento. Sin embargo, se ha encontrado que la degradación de HAPs después de ser absorbidos por las células algales el metabolismo es preferentemente por la vía de enzimas dioxigenasas en lugar de la ruta de la monooxigenasa, porque la producción de *cis*-dihidrodiol es favorecida (Warshawsky, 1988).

En las **Figuras 25 y 26** se observa que las concentraciones máximas encontradas para los metabolitos 5,6-dBaA y 8,9-dBaA en el medio líquido para *S. capricornutum* son  $19.58 \pm 1.49$  y  $38.03 \pm 7.51$  ng/mL y para *S. acutus* son  $20.81 \pm 1.48$  y  $47.34 \pm 2.42$  ng/mL, en tanto que para la biomasa las concentraciones máximas fueron para *S. capricornutum*  $5.83 \pm 0.35$  y  $19.93 \pm 2.75$  ng/mg y para *S. acutus*  $1.48 \pm 0.4$  y  $5.25 \pm 0.67$  ng/mg, respectivamente. Es de aclararse que estas concentraciones máximas en el medio líquido y biomasa no corresponden al mismo tiempo de incubación para cada especie debido a que *S. acutus* degrada más lento.

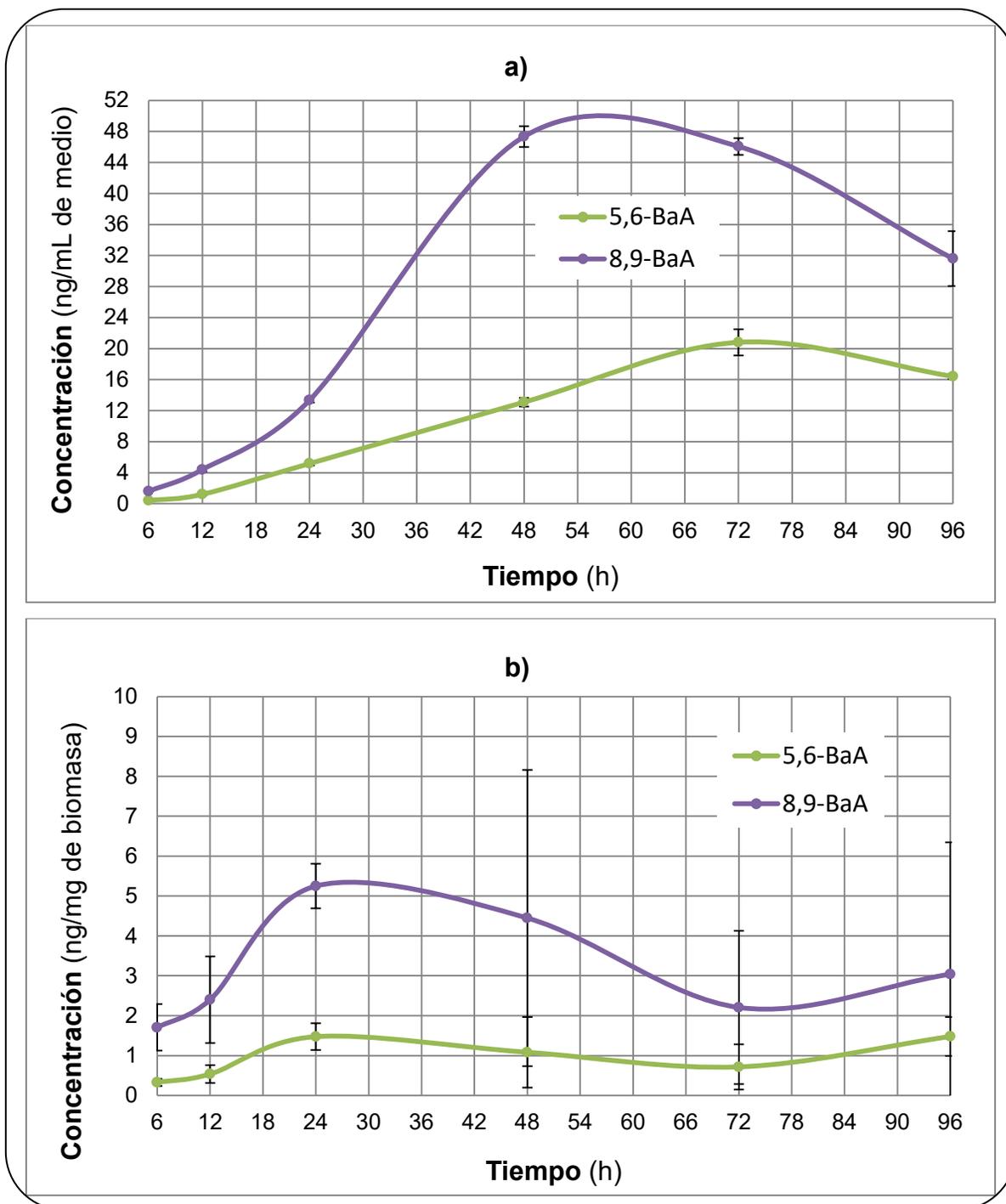
Por otra parte, observando los resultados mostrados en la **Figura 27** acerca de la cantidad total o neta (suma de la cantidad encontrada en medio líquido y biomasa) de cada metabolito, se nota que la mayor cantidad producida del 5,6-dBaA es por la microalga *S. acutus* con  $338.20 \pm 24.02$  ng (72 h), mientras que para *S. capricornutum* es de  $312.62 \pm 22.41$  ng (12 h). En el caso de este metabolito las cantidades máximas son muy similares aunque son producidas en diferentes tiempos por cada especie. Para el metabolito 8,9-dBaA *S. acutus* parece formarlo más, en  $753.89 \pm 38.94$  ng (48 h). Mientras que *S. capricornutum*  $582.95 \pm 131.53$  ng (12 h). Sin embargo, se realizó una prueba estadística de ANOVA como se menciona más adelante para comparar estos puntos de mayor producción de metabolitos, encontrando que ambas microalgas los producen en igual cantidad.

Además, para *S. acutus* la cantidad total del metabolito 5,6-dBaA en 72 y 96 h con respecto a la cantidad dopada para el bioensayo ( $4.3 \mu\text{g}$  de BaA) se obtiene que lo formado representa un 7.8 y 6.6%, respectivamente. Los porcentajes obtenidos con *S. capricornutum* a las 12 y 48 h son 7.2 y 4.1%, respectivamente. Estos porcentajes son muy bajos considerando que lo adicionado de BaA es 100%. Por lo tanto considerando los tiempos de aparición de metabolitos *S. capricornutum* es más rápida que *S. acutus*, aunque ambas son igual de eficientes en degradar porque producen porcentajes máximos parecidos. En cambio, para *S. acutus* es más difícil de definir el máximo del metabolito 8,9-dBaA.

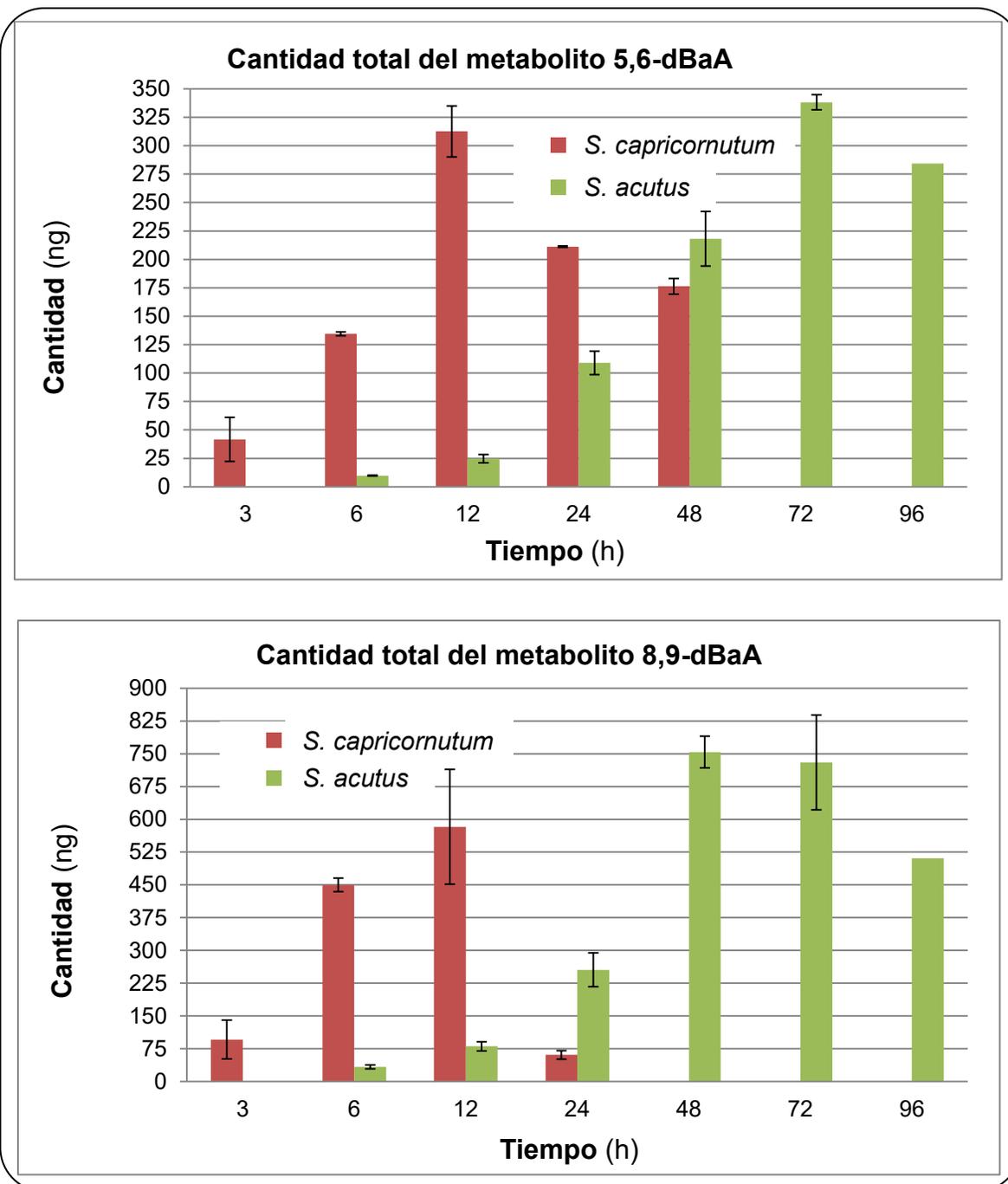
Cabe destacar que la suma de los metabolitos 5,6- y 8,9-dBaA en tiempo de formación máxima, representan un 24 y 20% con respecto a la cantidad inicial utilizada de BaA ( $4.3 \mu\text{g}$ ) para las microalgas *S. acutus* y *S. capricornutum*, respectivamente. Esto ayuda a deducir que es muy probable que se formen otros metabolitos, aún desconocidos.



**Figura 25.** Evolución de la concentración de metabolitos a) en medio líquido y b) en biomasa (ajustada la biomasa a 5 mg) por cultivos de *S. capricornutum* respecto al tiempo de exposición.



**Figura 26.** Evolución de la concentración de metabolitos a) en medio líquido y b) en biomasa (ajustada la biomasa a 5 mg) por cultivos de *S. acutus* respecto al tiempo de exposición.



**Figura 27.** Gráficos de la cantidad neta (líquido más biomasa) de metabolitos en función del tiempo de exposición.

En seguida se muestran las cantidades obtenidas de los dihidrodioles del benzo[a]antraceno en medio líquido y biomasa en la **Tabla 22**, por las microalgas inmovilizadas a los diferentes tiempos de bioensayo.

**Tabla 22.** Cantidades de metabolitos por microalgas inmovilizadas.

Cantidad (ng)								
Microalga	<i>Selenastrum capricornutum</i>				<i>Scenedesmus acutus</i>			
	Líquido		Biomasa		Líquido		Biomasa	
Medio	5,6	8,9	5,6	8,9	5,6	8,9	5,6	8,9
dBaA								
Tiempo (h)								
<b>3</b>	5.55 ±1.78	23.45 ±3.81	36.12 ±18.84	72.46 ±42.63	-	-	-	-
<b>6</b>	96.02 ±2.32	318.79 ±5.97	38.45 ±0.89	131.04 ±8.17	6.11 ±0.49	24.08 ±0.81	3.60 ±0.54	9.17 ±1.36
<b>12</b>	293.63 ±22.38	570.44 ±12.62	18.99 ±2.94	12.51 ±3.64	18.12 ±1.68	66.03 ±6.93	6.50 ±1.33	14.34 ±3.15
<b>24</b>	208.59 ±0.62	60.90 ±8.48	2.61 ±0.80	*	77.61 ±3.07	200.16 ±8.07	31.34 ±0.26	55.39 ±3.04
<b>48</b>	174.39 ±6.16	*	1.93 ±0.32	*	196.47 ±7.41	710.17 ±36.23	21.64 ±1.67	43.72 ±3.71
<b>72</b>	-	-	-	-	312.16 ±22.27	691.02 ±29.0	26.05 ±1.44	39.36 ±3.23
<b>96</b>	-	-	-	-	246.16 ±4.47	473.99 ±95.05	38.19 ±1.72	36.99 ±9.70

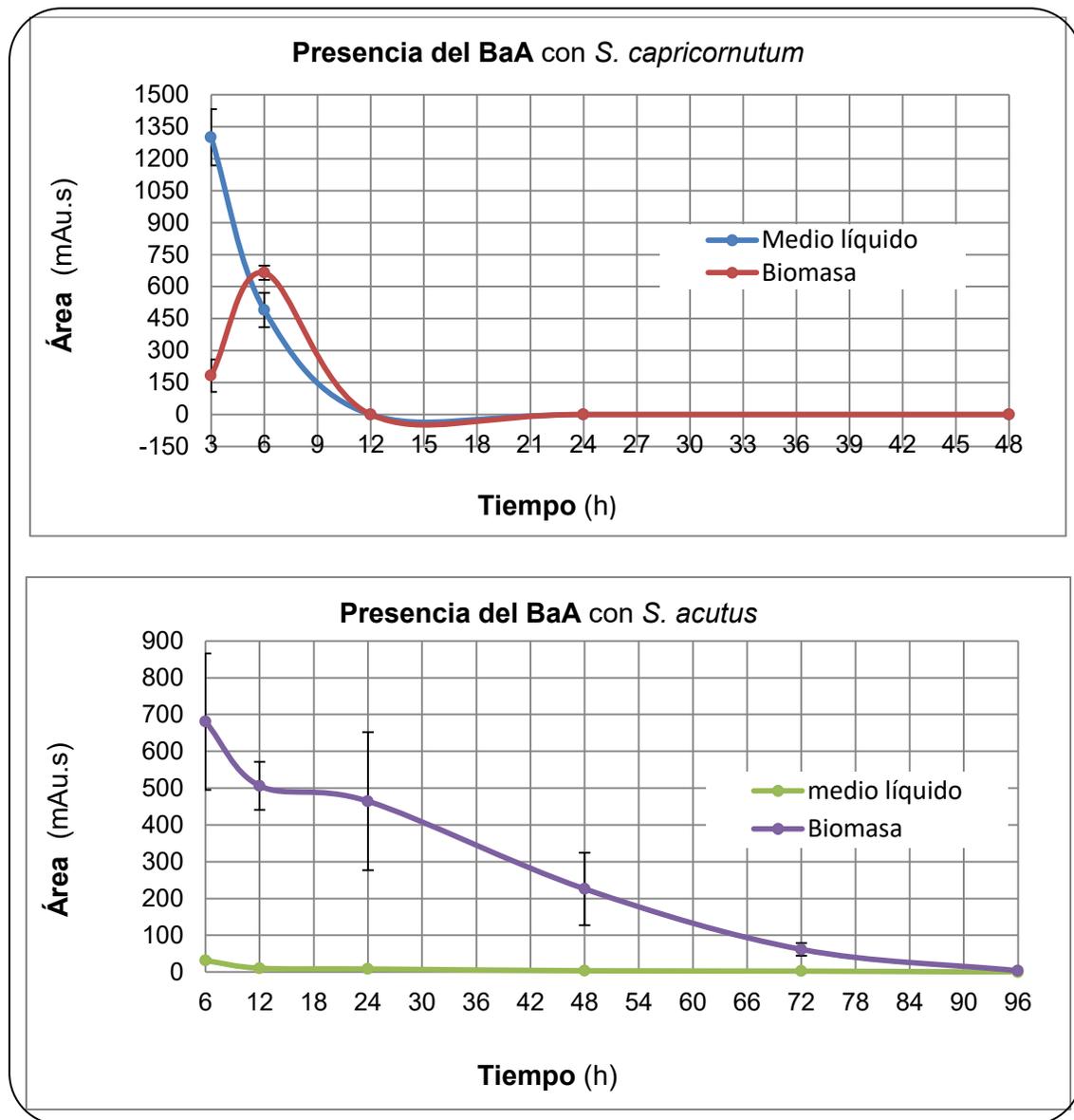
Producidas a partir de 4.3 µg de BaA con su desviación estándar correspondiente, en función del tiempo de exposición. El símbolo (\*) indica sin señal detectada y el símbolo (-) bioensayo no realizado.

Debido a la dispersión que se observó en los datos para los tiempos en donde se obtienen las mayores cantidades producidas de metabolitos (barras de error en **Figura 27**), se decidió hacer una prueba estadística de análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) para cada metabolito con el propósito de poder distinguir si *S. acutus* tiene la capacidad de degradar más BaA que *S. capricornutum*. De acuerdo al ANOVA presentado en el apartado 7.6, se encuentra que la cantidad máxima producida de cualquiera de los dos metabolitos por una microalga es igual, estadísticamente, que la producida por la otra microalga, independientemente de los tiempos del bioensayo en donde se encuentra este máximo. Por lo tanto es indistinto emplear una microalga u otra, ya que la cantidad máxima producida de cualquier metabolito ya sea 5,6- u 8,9-dBaA siempre será la misma.

#### 4.6.1.2 Monitoreo del BaA

Para el monitoreo cualitativo de la presencia del BaA en el medio líquido y en la biomasa, se observó que a tiempos de exposición mayores a 12 h para ambas microalgas, la señal detectada en UV comenzó a disminuir a tal grado de presentar una tendencia por debajo de la detección. Así continua su eliminación por biodegradación está demostrada en ambas especies por la pérdida gradual del BaA en el medio líquido y la biomasa. El comportamiento que se observa de la presencia del BaA es decreciente conforme aumenta el tiempo de exposición. Al poner en contacto las microalgas inmovilizadas con 4.3 µg de BaA, éstas van

degradándolo conforme pasa el tiempo. Comparando el comportamiento de ambas microalgas en la disminución o desaparición del BaA se puede especular que la entrada del BaA a la célula se hace de forma efectiva, pero en el caso de *S. acutus* parece estar atrapado más tiempo el hidrocarburo, antes de su degradación. En la **Figura 28** se muestra el seguimiento del BaA recuperado en el extracto B, tanto para medio líquido como para biomasa. En este caso no se pudo hacer una cuantificación de BaA dado que parte importante se perdió en el extracto A y en él no fue posible cuantificar dado el ensanchamiento exagerado del pico como se mencionó en la sección 4.3 (pág. 51). Sin embargo el análisis cualitativo del BaA muestra la tendencia, de su comportamiento en el bioensayo de manera muy clara.



**Figura 28.** Monitoreo cualitativo del BaA en función del tiempo de bioensayo para microalgas inmobilizadas.

#### 4.6.1.3 Comparación con cultivos de algas libres

Finalmente, se presenta la comparación de las cantidades máximas encontradas para cada metabolito para *S. capricornutum*. Se escogió a esta especie por su mejor definición de los máximos de formación de los metabolitos. Se escogió el tiempo de incubación de 6 h de acuerdo a lo reportado por García de Llasera & García-Cicourel, 2016 como tiempo de máxima formación total de los metabolitos del BaA con las microalgas libres.

En la **Tabla 23** se muestran los resultados de estos bioensayos para 6 h con microalgas libres y 12 h para microalgas encapsuladas. Como es de suponerse, la diferencia cubre los dos tiempos de formación es de 6 h corresponde al tiempo en que los metabolitos difunden en el alginato: el BaA del medio a las células y los metabolitos en sentido inverso. Es de notarse que las microalgas producen cantidades globales similares de metabolitos, puede probarse estadísticamente para complementar, aun cuando están inmovilizadas. De hecho, si se suman las cantidades globales de los dos metabolitos formados se obtiene un valor de 991 ng para las microalgas libres y de 895 ng para las microalgas encapsuladas. Estos resultados indican que las facultades de degradación de las microalgas no parecen ser afectadas por la inmovilización. En cuanto a los porcentajes que representan estas cantidades con respecto a los 4.3 µg agregados de BaA inicialmente se encuentran valores entre 23-21%. Estos porcentajes no representan la degradación completa del BaA y con seguridad deben de formarse otros metabolitos lo cual representa aún necesidad de mayor investigación en este proceso de degradación.

**Tabla 23.** Cantidades máximas de metabolitos para *S. capricornutum* inmovilizada y libre (n=3).

Cantidad (ng)				
Estado	Libres		inmovilizadas	
Microalga	<i>S. capricornutum</i>		<i>S. capricornutum</i>	
Bioensayo (h)	6		12	
Muestra	líquido	biomasa	líquido	biomasa
5,6-dBaA	177.67±16.87	21.49±2.55	293.63±22.38	18.99±2.94
8,9-dBaA	713.09±41.02	78.96±6	570.44±112.62	12.51±3.64

## V. CONCLUSIONES

En este trabajo se cumplió con el objetivo de evaluar la degradación de benzo[a]antraceno por las microalgas *S. capricornutum* y *S. acutus* inmovilizadas exitosamente en alginato de calcio, cuantificando los dihidrodioles como productos de degradación.

Se logró la separación y se establecieron las condiciones de detección óptimas mediante HPLC-FD, para el análisis de los metabolitos del BaA: *cis*-5,6-dihidrodiol, *trans*-8,9-dihidrodiol y *trans*-10,11-dihidrodiol.

Se optimizaron métodos de extracción por EFS y DMFS logrando altos porcentajes de recobro para los tres metabolitos estudiados; para el caso de las microalgas inmovilizadas fueron superiores a 81% para *S. acutus* y mayores a 86% para *S. capricornutum* y en el caso de las dos especies de microalgas libres se obtuvieron porcentajes de recobro por arriba del 90%.

La validación de la metodología EFS-HPLC-FD y DMFS-HPLC-FD permitieron tener resultados fiables para la cuantificación de los metabolitos en los ensayos de exposición en condiciones controladas.

Así se encontró la formación de 5,6-dBaA y 8,9-dBaA por ambas microalgas, tanto libres como inmovilizadas. Se observaron diferencias en el tiempo en que se efectúa el proceso de biodegradación entre las microalgas inmovilizadas y las libres. Este tiempo que fue de aproximadamente 6 h que representan el tiempo de difusión de los analitos a través del alginato. *S. capricornutum* formó los metabolitos aproximadamente cuatro veces más rápido que *S. acutus*, independientemente de si se encuentran inmovilizadas o no.

Los resultados del monitoreo cualitativo de la presencia de BaA en medio líquido y biomasa, presenta un comportamiento decreciente conforme aumenta el tiempo de exposición ya que las microalgas van degradándolo. Especialmente *S. acutus* parece retener al hidrocarburo por más tiempo antes de su degradación.

Finalmente se puede afirmar que la remoción y degradación del BaA igualmente efectiva con microalgas libres e inmovilizadas, siendo esta modalidad más ventajosa para su aplicación en metodologías de biorremediación de medios acuosos contaminados.

## VI. REFERENCIAS

- Alfarhani, B., Al-tameemi, M., Schenone, A.V., (...), Barbosa, F., Campiglia, A.D.** 2016. *Room temperature fluorescence spectroscopy of benzo[a]pyrene metabolites on octadecyl extraction membranes*. *Microchemical Journal* 129, 83-89.  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.06.010>
- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades.** *ToxFAQs™-Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) [Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)]*. Consultado el 28 de marzo de 2017 en: <https://goo.gl/HCyIYY>
- Agrawal, N., Shahi, S.K.** 2017. *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (pyrene) using novel fungal strain Corioloopsis byrsina strain APC5*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 122, 69-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.024>
- Ali, O.A., Tarek, S.J.** 2009. *Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from Ismailia Canal water by chlorine, chlorine dioxide and ozone*. *Desalination and Water Treatment* 1 (1-3), 289-298. <http://dx.doi.org/10.5004/dwt.2009.131>
- Avendaño-Romero, G.C., López-Malo, A., Palou, E.** 2013. *Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos*. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7(1), 87-96.  
<https://goo.gl/FQL0d6>
- Barker, S.A.** 2000. *Matrix solid-phase dispersion*. *Journal of Chromatography A* 885(1-2), 115-127. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00249-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00249-1)
- Barker, S.A.** 2007. *Matrix solid phase dispersion (MSPD)*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70(2), 151-162. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.06.005>
- Bernal Toris, D.N.** 2015. Tesis. Evaluación de la capacidad de *Selenastrum capricornutum* inmovilizada en alginato para remover Benzo[a]pireno de medio de cultivo acuoso. *Universidad Nacional Autónoma de México*.  
<http://132.248.9.195/ptd2015/mayo/306136067/Index.html>
- Busetti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P.** 2006. *Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant*. *Journal of Chromatography A* 1102, 104-115.  
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.013>
- Canosa Rodríguez Ma.P.** 2008. Tesis. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenes. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. *Universidad de Santiago de Compostela*.  
<https://goo.gl/HPo4Kv>
- Camel, V.** 2003. *Solid phase extraction of trace elements*. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*, 58(7), 1177-1233. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(03\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00072-7)

- Castillo Morales, G.** 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercambio, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de tecnología del Agua. México. pp 80. <https://goo.gl/cUC7zn>
- Cerniglia, C.E.** 1993. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Current Opinion in Biotechnology 4(3), 331-338. [http://doi.org/10.1016/0958-1669\(93\)90104-5](http://doi.org/10.1016/0958-1669(93)90104-5)
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., Dodge, R.H.** 1994. *Metabolism of benz[a]anthracene by the filamentous fungus Cunninghamella elegans*. Source of the Document Applied and Environmental Microbiology 60(11), 3931-3938. <https://goo.gl/8FmxXu>
- Dabestani, R., Ivanov, I. N.** 1999. *A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Photochemistry and Photobiology 70(1), 10-34. <http://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb01945.x>
- Daly GL, Lei YD, Castillo LE, Muir DCG, Wania F.** 2007. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in Costa Rican air and soil: A tropical/temperate comparison*. Atmospheric Environment 41, 7339-7350. <http://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.05.014>
- De-Bashan, L.E., Bashan, Y.** 2010. *Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects*. Bioresource Technology 101(6), 1611-1627. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- Díaz, N.E., Alfaro, J.M., Garza, H.** 2001. *Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable*. Ciencia UANL 4(4) 420-425. <https://goo.gl/glb80m>
- Díaz Rojas M.** 2015. Tesis. Análisis cromatográfico aplicado a la evaluación de la biorremoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio acuoso con diferentes cantidades de microalgas. *Universidad Nacional Autónoma de México*. <http://132.248.9.195/ptd2015/octubre/410009569/Index.html>
- Díaz-Báez, M.C., Bustos López, M.C., Espinoza Ramírez, A.J.** 2004. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia ed. Colombia, Bogotá. pp. 45. <https://goo.gl/X1qxyH>
- Dreckmann, K.M., Senties, A., Núñez, M.L.** 2013. *Manual de prácticas de laboratorio Biología de Algas*. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F. pp 13-18. <https://goo.gl/LHzm11>
- Domínguez Gutiérrez, C.** 2008. Tesis. Desarrollo de un método de análisis por técnicas cromatográficas para la determinación de HAPs y sus metabolitos en fluidos biológicos. *Universidad Nacional Autónoma de México*. <http://132.248.9.195/ptd2008/noviembre/0635951/Index.html>
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., Cañizares-Villanueva, R. O.** 2006. *Procesos de bioremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos*. Revista Latinoamericana de Microbiología 48(2), 179-187. <https://goo.gl/cZi5M6>

- Gan, S., Lau, E.V., Ng, H.K.** 2009. *Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*. Journal of Hazardous Materials 172(2-3), 532-549.  
<http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.118>
- García Cicourel A. R.** 2015. Tesis. Caracterización cromatográfica y espectral de compuestos de degradación provenientes de los HAPs con aplicación a su monitoreo en cultivos de microalgas. *Universidad Nacional Autónoma de México*.  
<http://132.248.9.195/ptd2015/junio/304058569/Index.html>
- García de Llasera, M. P., Olmos-Espejel, J.J., Díaz-Flores, G., Montaña-Montiel, A.** 2016. *Biodegradation of benzo(a)pyrene by two freshwater microalgae Selenastrum capricornutum and Scenedesmus acutus: a comparative study useful for bioremediation*. Environmental Science and Pollution Research 23, 3365–3375.  
<http://doi.org/10.1007/s11356-015-5576-2>
- García de Llasera, M.P., García-Cicourel, A. R.** 2017. *On-line SPE chromatography with spectrophotometric diode array detection as a simple and advantageous choice for the selective trace analysis of benzo(a)anthracene degradation products from microalgae*. Talanta 165, 584-592. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.011>
- Gibson D.T., Mahadevan V., Jerina D.M., Yogi H., Yeh H.J.** 1975. *Oxidation of the carcinogens benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium*. Science 189(4199), 295-7. <https://doi.org/10.1126/Science.1145203>
- Ghosal, D., Dutta, A., Ghosh, S., Dutta, TK., Ahn, Y.** 2016. *Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review*. Frontiers in Microbiology 7(1369), 1-27. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P.** 2009. *Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review*. Journal of Hazardous Materials 169(1-3), 1-15.  
<http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Harris C. D.** 2001. *Análisis Químico Cuantitativo*, 2ª Ed, Editorial Reverté S.A., España, Barcelona pp. 74,77-79, 630. <https://goo.gl/EtriLN>
- Hennion, M.-C.** 1999. *Solid-phase extraction: Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A 856(1-2), 3-54.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00832-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00832-8)
- Hernández Blanco, F.J., García de Llasera, M.P.** 2016. *Monitoring dihydrodiol polyaromatic hydrocarbon metabolites produced by the freshwater microalgae Selenastrum capricornutum*. Chemosphere 158, 80-90.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.065>

- Hernández Camarillo M.** 2015. Método de extracción en fase sólida en la punta de micropipeta para el aislamiento de trazas de HAPs en suspensiones acuosas de microorganismos. *Universidad Nacional Autónoma de México*.  
<http://132.248.9.195/ptd2015/junio/303093329/Index.html>
- Herrera Murillo, J., Chaves-Villalobos, M. del C.** 2012. *Validación de un método de análisis para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía líquida de alta eficiencia en partículas PM10 Y PM.5*. *Tecnología en Marcha* 25(3), 40-49.  
<https://goo.gl/s6YWQK>
- Hidrocarburos aromáticos policíclicos.** *Environmental health criteria, No. 202*. Programa del medio ambiente de las naciones unidas organización internacional del trabajo organización mundial de la salud. Ginebra, 1998. <https://goo.gl/IOa2jo>
- International Conference on Harmonisation.** 2005. *Validation of analytical Procedures: text and methodology Q2(R1)*. Guía de apoyo, 4<sup>o</sup> versión, Estados Unidos.  
<https://goo.gl/2noVPw>
- Jin, J.-N., Yao, J., Zhang, Q.-Y., (...), Peng, D.-N., Choi, M.M.F.** 2015. *An integrated approach of bioassay and molecular docking to study the dihydroxylation mechanism of pyrene by naphthalene dioxygenase in Rhodococcus sp. ustb-1*. *Chemosphere* 128, 307-313.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.012>
- Johnsen A.R., Karlson U.** 2007. *Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bio-availability, and microbial degradation*. *Applied Microbiology Biotechnology* 76(3), 533-543. <http://doi.org/10.1007/s00253-007-1045-2>
- Jonsson, G., Taban, I.C., Jørgensen, K.B., Sundt, R.C.** 2004. Quantitative determination of de-conjugated chrysene metabolites in fish bile by HPLC-fluorescence and GC-MS. *Chemosphere* 54(8), 1085-1097. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.09.026>
- Juhasz A.L., Naidu R.** 2000. *Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45(1-2), 57-88. [http://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00052-4](http://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00052-4)
- Kim K. H., Jahan Sh. A., Kabair E., Brown R.J.C.** 2013. *A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects*. *Environment International* 60, 71-80. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
- Lei, A.-P., Hu, Z.-L., Wong, Y.-S., Tam, N.F.-Y.** 2007. *Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species*. *Bioresource Technology* 98(2), 273-280.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.012>
- León Santiago M.** 2016. Tesis. Bioremediación de contaminantes orgánicos de medio acuoso con sistemas algales. *Universidad Nacional Autónoma de México*.  
<http://132.248.9.195/ptd2016/mayo/514022475/Index.html>

- Liu, D., Pan, L., Li, Z., Cai, Y., Miao, J.** 2014. *Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam Ruditapes philippinarum exposed to benzo[a]pyrene.* *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 251-259. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.024>
- Lürling, M., Van Donk, E.** 1999. *Grazer-induced colony formation in Scenedesmus acutus (chlorophyceae): Ecomorph expression at different temperatures.* *Journal of Phycology*, 35(6), 1120-1126. <http://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3561120.x>
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak B., Klimkowicz-Pawlas A.** 2009. *Concentrations, sources, and spatial distribution of individual polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils in the Eastern part of the EU: Poland as a case study.* *Science of Total Environment* 407, 3746-3753. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.01.010>
- Manariotis, I.D., Karapanagioti, H.K., Chrysikopouls, C.V.** 2011. *Degradation of PAHs by high frequency ultrasound.* *Water Research*, 45(8), 2587-94. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.009>
- Marcé, R.M., Borrull, F.** 2000. *Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds.* *Journal of Chromatography A* 885(1-2), 273-290. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00428-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00428-3)
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J.** 1992. *Ambient concentrations and exposure to carcinogenic PAHs in the environment.* *Environment Science Technology* 26(7), 1278-1284. <http://doi.org/10.1021/es00031a002>
- Miller, N. J. y Miller, J. C.** 2002. *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4ª Ed, Pearson Educación S.A., España, Madrid. pp. 120-125, 141. <https://goo.gl/FMy7GY>
- Montaño Montiel A.** 2012. *Manual de cultivo de microalgas Selenastrum capricornutum, Scenedesmus acutus f. alternas. Manual interno para el cultivo de microalgas de agua dulce y su mantenimiento en condiciones de laboratorio.* Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 4-6
- Montaño Montiel A.** 2013. Tesis. Remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en medio acuoso por *Scenedesmus acutus*. *Universidad Nacional Autónoma de México.* <http://132.248.9.195/ptd2013/noviembre/0704950/Index.html>
- Olmos Espejel J. J.** 2013. Tesis. Metodologías cromatográficas en línea para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microorganismos. *Universidad Nacional Autónoma de México.* <http://132.248.9.195/ptd2013/marzo/097153832/Index.html>
- Olmos-Espejel, J.J., García de Llasera, M. P. Velasco-Cruz, M.** 2012. *Extraction and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo[a]pyrene metabolites in microalgae cultures by off-line/on-line methodology based on matrix solid-phase dispersion, solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography.* *Journal of Chromatography A* 1262, 138-147. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.015>

- Ortiz-Salinas, R., Cram, S., Sommer, I.** 2012. *Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos de la llanura aluvial baja del Estado de Tabasco, México*. Universidad y Ciencia, Trópico Húmedo 28(2), 131-144. <https://goo.gl/i2mSSm>
- Pampanin, D.M., Kemppainen, E.K., Skogland, K., Jørgensen, K.B., Sydnes, M.O.** 2016. *Investigation of fixed wavelength fluorescence results for biliary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons formed in Atlantic cod (Gadus morhua)*. Chemosphere 144, 1372-1376. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.013>
- Peña, A., Morales, J., Labastida, C., Capella, S.** 2003. *Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 19(1), 13-23. <https://goo.gl/ccfnbF>
- Petróleos Mexicanos (PEMEX).** *Informe anual 2015*. Publicado en Abril de 2016. Consultado 25 abril 2017. Disponible en: <https://goo.gl/GYZeYh>
- Plaza-Bolaños, P., Frenich, A.G, Vidal, J.L.M.** 2010. *Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends*. Journal of Chromatography A 1217(41), 6303-6326. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.079>
- Pratt, M. M., John, K., MacLean, A. B., Afework, S., Phillips, D. H., & Poirier, M. C.** 2011. *Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA adduct semi-quantitation in archived human tissues*. International Journal of Environmental Research and Public Health 8(7), 2675–2691. <http://doi.org/10.3390/ijerph8072675>
- Rapp Wright, H.L.** 2014. Tesis. Determinación de contaminantes orgánicos prioritarios como los hidrocarburos aromáticos policíclicos empleando novedosas técnicas microextractivas y cromatográficas. *Universidad de La Laguna, España*. <https://goo.gl/C9hhg0>
- Ramsauer, B., Sterz, K., Hagedorn, HW., (...), Shepperd, J., Cheung, F.** 2011. *A liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of phenolic polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAH) in urine of non-smokers and smokers*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 399(2), 47-54. <http://doi.org/10.1007/s00216-010-4355-7>
- Richmond, A., Hu, Q.** 2013. *Handbook of Microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2ª Ed. John Wiley & Sons. NJ, USA. pp. 3-19. <https://goo.gl/CpXrEy>
- Rodríguez, C., Ruber, E., Gutiérrez, H., Orlando, J.** 2002. Tesis. Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4-Benzopireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. pp. 104. <https://goo.gl/dBFAIN>
- Rogers S.W., Ong, S.K., Kjartanson, B.H., et al.** 2002. *Natural attenuation of polycyclic Aromatic hydrocarbon contaminated sites: review*. Practice Periodical of Hazardous Toxic and Radioactive Waste Management 6(3), 141-155. [http://doi.org/10.1061/\(ASCE\)1090-025X\(2002\)6:3\(141\)](http://doi.org/10.1061/(ASCE)1090-025X(2002)6:3(141))

- Rubio-Clemente A., Torres-Palma R., Peñuela G.** 2014. *Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review.* *Science of the Total Environment*, 478, 201-225.  
<http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.126>
- Ruiz-Marín, A., Mendoza-Espinoza, G. L., Sánchez-Saavedra M. del P.** 2011. *Photosynthetic characteristics and growth of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus*.* *Agrociencia* 45, 303-313. <https://goo.gl/UyCgC8>
- Schoeny, R., Cody, T., Warshawsky, D., Radike, M.** 1988. *Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species.* *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 197(2), 289-302. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90099-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90099-1)
- Sette, C.B., Pedrete, T.D.A., Felizzola, J., (...), Scofield, A.D.L., Wagener, A.D.L.R.** 2013. *Formation and identification of PAHs metabolites in marine organisms.* *Marine Environmental Research* 91, 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.02.004>
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch S.R.** 2008. *Principios de análisis instrumental*, 6ª Ed, Cengage Learning Editores, Cd. Mx., México pp. 816-817, 823-825, 829-830, 832.
- Skupińska, K., Misiewicz, I., Kasprzycka-Guttman, T.** 2004. *Polycyclic aromatic hydrocarbons: Physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms.* *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 61(3), 233-240.  
<https://goo.gl/Xo2IE9>
- Smidsrød, O., Skjåk-Brik, G.** 1990. *Alginate as immobilization matrix for cells.* *Trends in Biotechnology* 8, 71-78. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-O](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O)
- Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., (...), Miller, D.W., Cerniglia, C.E.** 1992. *Identification of xyloside conjugates formed from anthracene by *Rhizoctonia solani*.* *Mycological Research* 96(6), 509-517. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81100-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81100-3)
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Simpson, C.G.** 1998. *Repeated removal of copper by alginate beads and the enhancement by microalgae.* *Biotechnology Techniques* 12(3), 187-190.  
<http://doi.org/10.1023/A:1008861122108>
- Thiele, S., Brummer, GW.** 2002. *Bioformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil under oxygen deficient conditions.* *Soil Biology Biochemistry* 34(12), 733-735.  
[http://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00204-8](http://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00204-8)
- Umar, Z.D., Aziz, N.A.A., Zulkifli, S.Z., Mustafa, M.** 2017. *Rapid biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using effective *Cronobacter sakazakii* MM045 (KT933253).* *MethodsX* 4, 104-117. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.02.003>

- Vela, N., Martínez-Menchón, M., Navarro, G., Pérez-Lucas, G., Navarro, S.** 2012. *Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from groundwater by heterogeneous photocatalysis under natural sunlight*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 232, 32-40. <http://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.02.003>
- Velasco Cruz M.** 2011. Tesis. Metodología analítica cromatográfica para la determinación de metabolitos de hidrocarburos aromáticos policíclicos en cultivos de microalgas. *Universidad Nacional Autónoma de México*.  
<http://132.248.9.195/ptd2012/marzo/0678489/Index.html>
- Wang, Y., Wang, Y.** 2007. *Estimating the octanol-water partition coefficients of NPAHs and PAHs by solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap detector*. Analytical Letters 40(2), 307-319. <http://dx.doi.org/10.1080/00032710600867663>
- Warshawsky, D., Radike, M., Jayasimhulu, K., and Cody, T.** 1988. *Metabolism of benzo(a)pyrene by a dioxygenase enzyme system of the freshwater green alga Selenastrum capricornutum*. Biochemical and Biophysical Research Communications 152, 540–544. [http://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80071-8](http://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80071-8)
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., (...), LaDow, K., Schneider, J.** 1995. *Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light*. Chemico-Biological Interactions 97 (2), 131-148. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(95\)03610-X](https://doi.org/10.1016/0009-2797(95)03610-X)
- Warshawsky, D., LaDow, K., Schneider, J.** 2007. *Enhanced degradation of benzo[a]pyrene by Mycobacterium sp. in conjunction with green alga*. Source of the Document Chemosphere 69(3), 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.031>
- Wick, A., Haus, N.W., Sukkariyah, B.F., Haering, K.C., Daniels, W.L.** 2011. *Remediation of PAH-contaminated soils and sediments: A literature review*. Documento de apoyo del Instituto Politécnico y Universidad estatal de Virginia. <https://goo.gl/ZwH7X4>
- Wilcke W, Krauss M, Safronov G, Fokin AD, Kaupenjohann M.** 2005. *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils of the Moscow Region—concentrations, temporal trends, and small-scale distribution*. Journal of Environmental Quality 34(5), 1581-1590. <https://goo.gl/Xg0NiW>

## VII. ANEXOS

### 7.1 Valores de *t* de Student

Tabla 4.2 ■ Valores de <i>t</i> de Student							
Grados de libertad	Nivel de confianza						
	50	90	95	98	99	99,5	99,9
1	1,000	6,314	12,706	31,821	63,657	127,32	636,619
2	0,816	2,920	4,303	6,965	9,925	14,089	31,598
3	0,765	2,353	3,182	4,541	5,841	7,543	12,924
4	0,741	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	8,610
5	0,727	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	6,869
6	0,718	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,959
7	0,711	1,895	2,365	2,998	3,500	4,029	5,408
8	0,706	1,860	2,306	2,896	3,355	3,832	5,041
9	0,703	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,781
10	0,700	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,587
15	0,691	1,753	2,131	2,602	2,947	3,252	4,073
20	0,687	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,850
25	0,684	1,708	2,068	2,485	2,787	3,078	3,725
30	0,683	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,646
40	0,681	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,551
60	0,679	1,671	2,000	2,390	2,660	2,915	3,460
120	0,677	1,658	1,980	2,358	2,617	2,860	3,373
∞	0,674	1,645	1,960	2,326	2,576	2,807	3,291

*Nota:* Al calcular los intervalos de confianza, en la ecuación 4.6 se puede sustituir *s* por  $\sigma$  si se tiene una gran experiencia con un método particular y se ha determinado por tanto la "verdadera" desviación estándar de la población. Si se usa  $\sigma$  en lugar de *s*, el valor de *t* que hay que usar en la ecuación 4.6 es el que figura en la última fila de la tabla 4.2.

Figura 29. Valores de *t* de Student Tomado de Daniel C. Harris, 2001, utilizada en el apartado 4.5.2 prueba estadística entre microalgas.

### 7.2 Espectros de fluorescencia para dihidrodioles del BaA

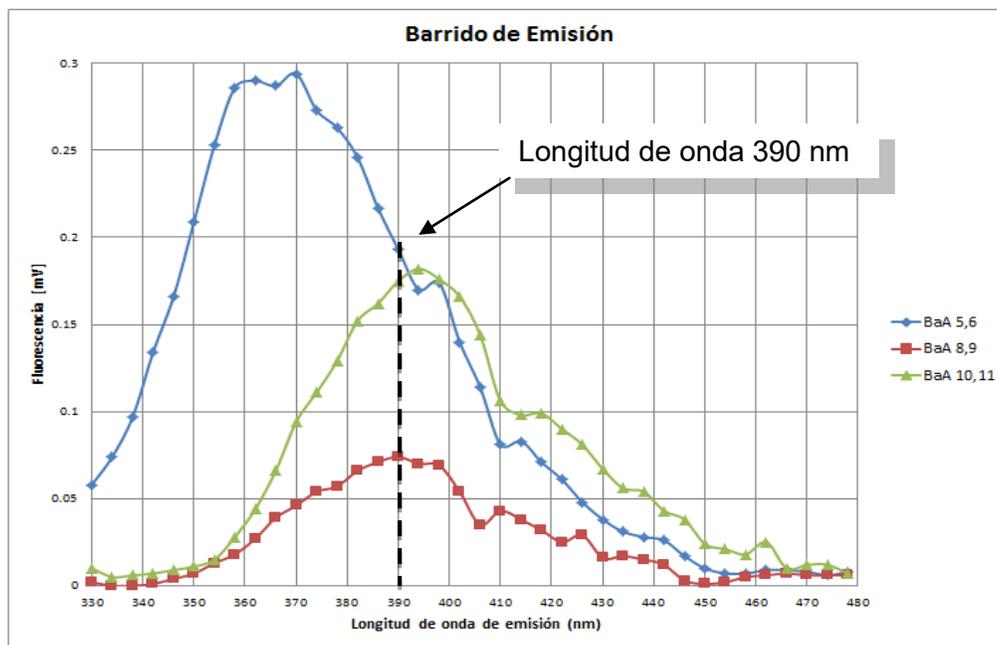
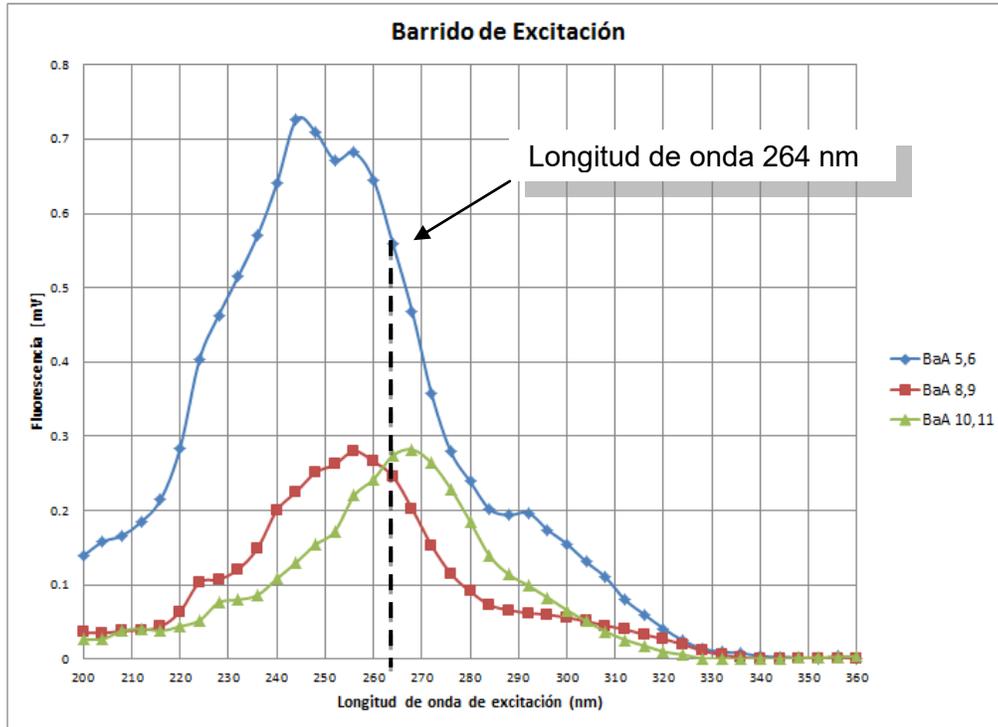
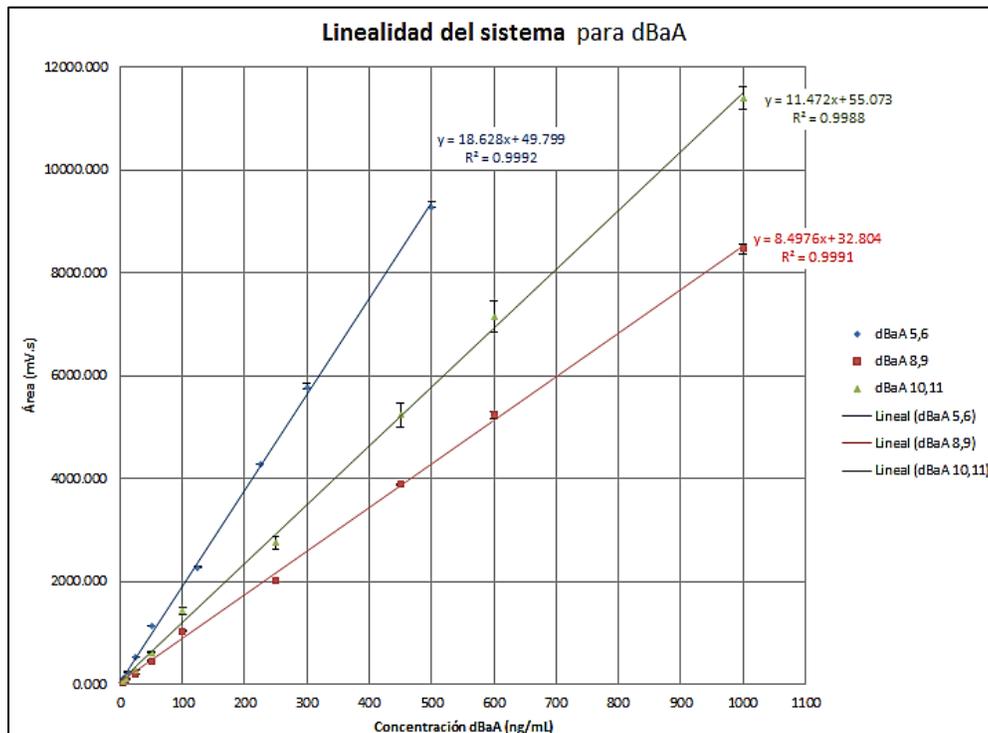


Figura 30. Barrido de emisión con el detector de fluorescencia para los metabolitos del BaA, fijando una longitud de onda de excitación de 280 nm.

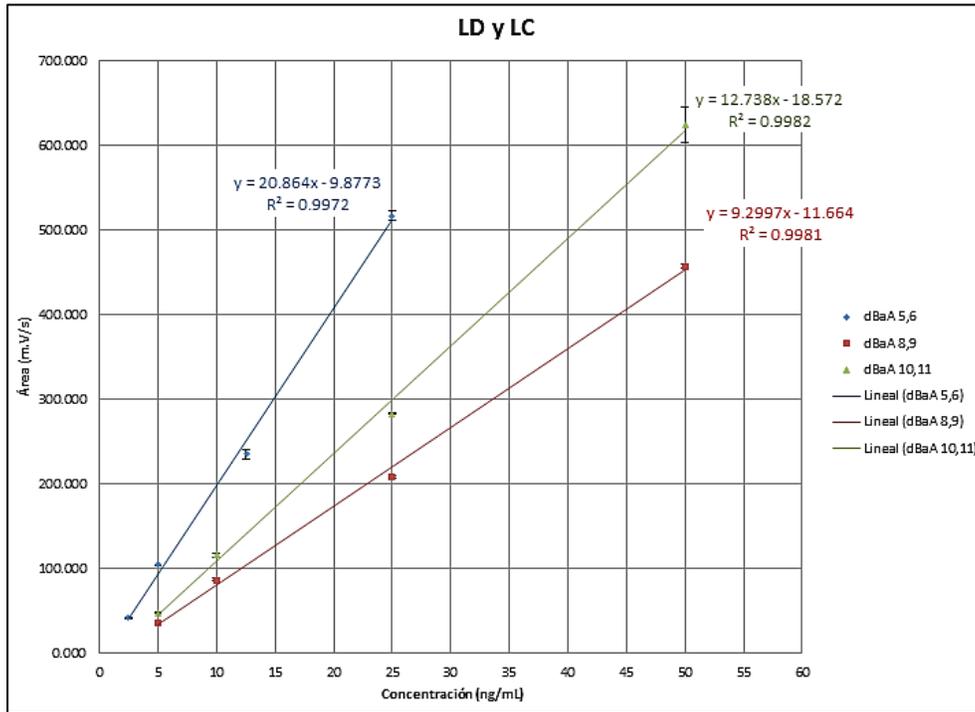


**Figura 31.** Barrido de excitación con el detector de fluorescencia para los metabolitos del BaA, fijando una longitud de onda de emisión de 390 nm.

### 7.3 Gráficos de la validación del sistema

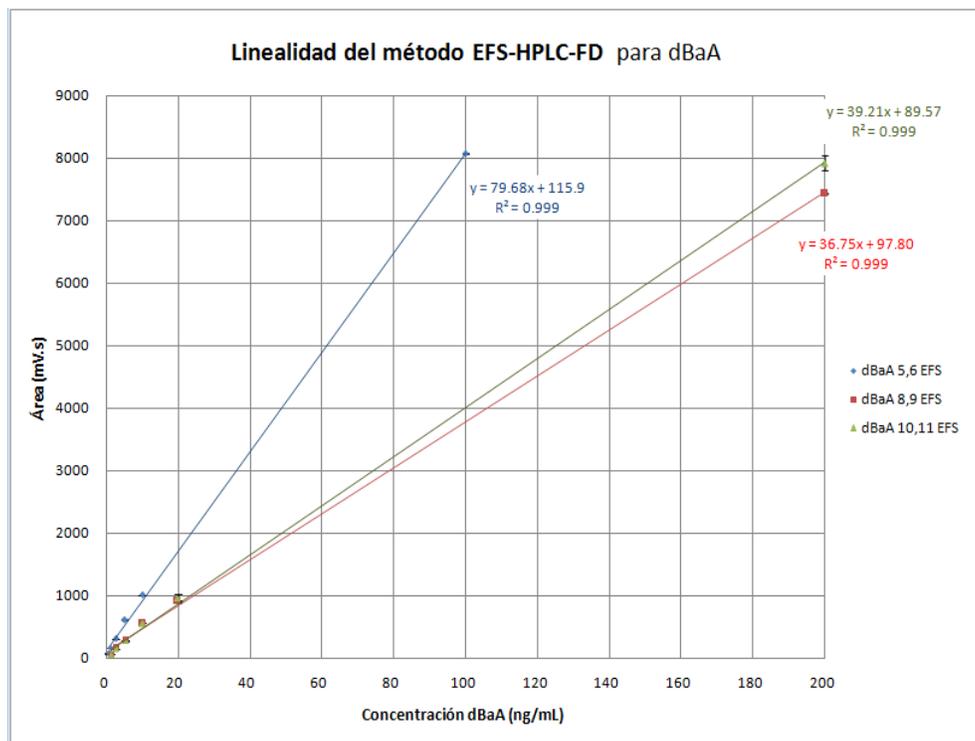


**Figura 32.** Gráficas obtenidas para la validación del sistema. Intervalo de 2.5 a 500 ng/mL para el 5,6-dBaA y de 5 a 1000 ng/mL para 8,9- y 10,11-dBaA.

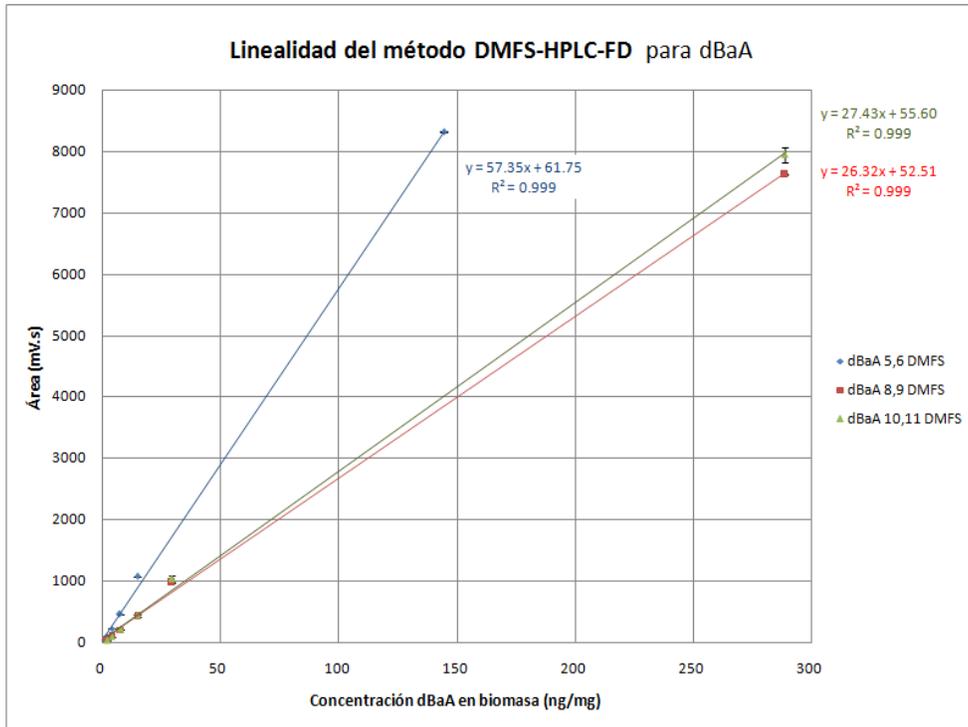


**Figura 33.** Gráfico trazado para la determinación de LDT y LCT del sistema, escogiendo las concentraciones menores a 50 ng/mL de las empleadas para la validación del sistema, en un intervalo de 2.5 a 25 ng/mL de 5,6-dBaA y de 5 a 50 para 8,9- y 10,11-dBaA.

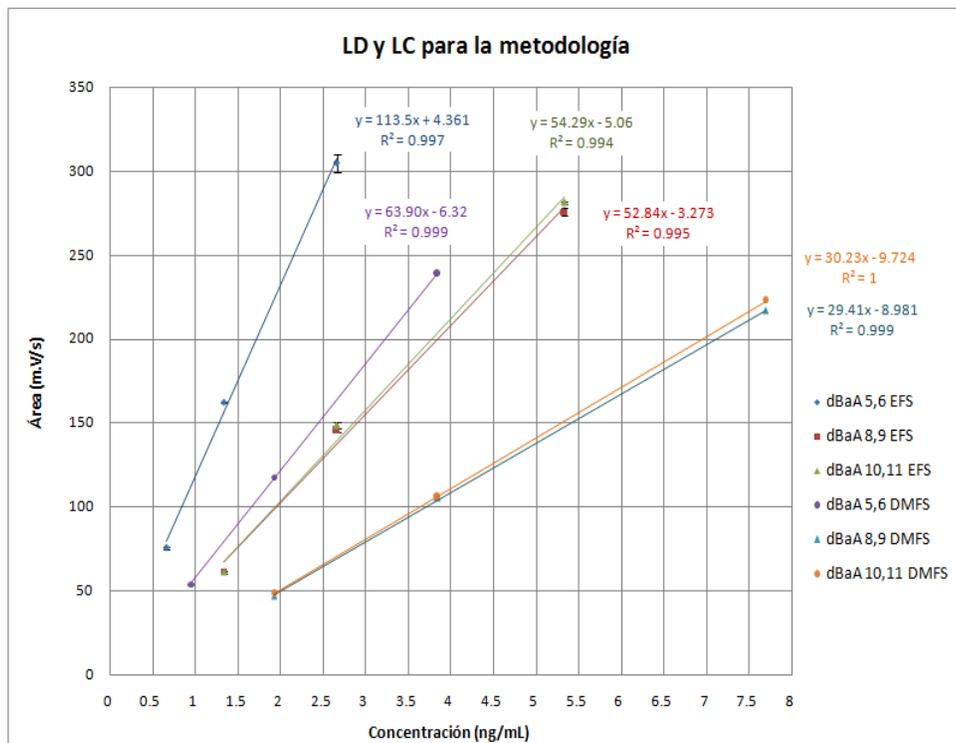
#### 7.4 Gráficos de la validación de la metodología



**Figura 34.** Graficas obtenidas para la validación del sistema. Intervalo de 0.67 a 100 ng/mL para el 5,6-dBaA y de 1.33 a 200 ng/mL para 8,9- y 10,11-dBaA.



**Figura 35.** Graficas obtenidas para la validación del sistema. Intervalo de 0.96 a 144.23 ng/mg para el 5,6-dBaA y de 1.92 a 288.46 ng/mg para 8,9- y 10,11-dBaA.



**Figura 36.** Gráfico trazado para la determinación de LDT y LCT de la metodología. Intervalo de 0.67 a 2.67 ng/mL y 0.96 a 3.85 ng/mg para el 5,6-dBaA y de 1.33 a 10.13 ng/mL y 1.92 a 7.69 ng/mg para 8,9- y 10,11-dBaA.

## 7.5 Gráficos de la validación de la metodología

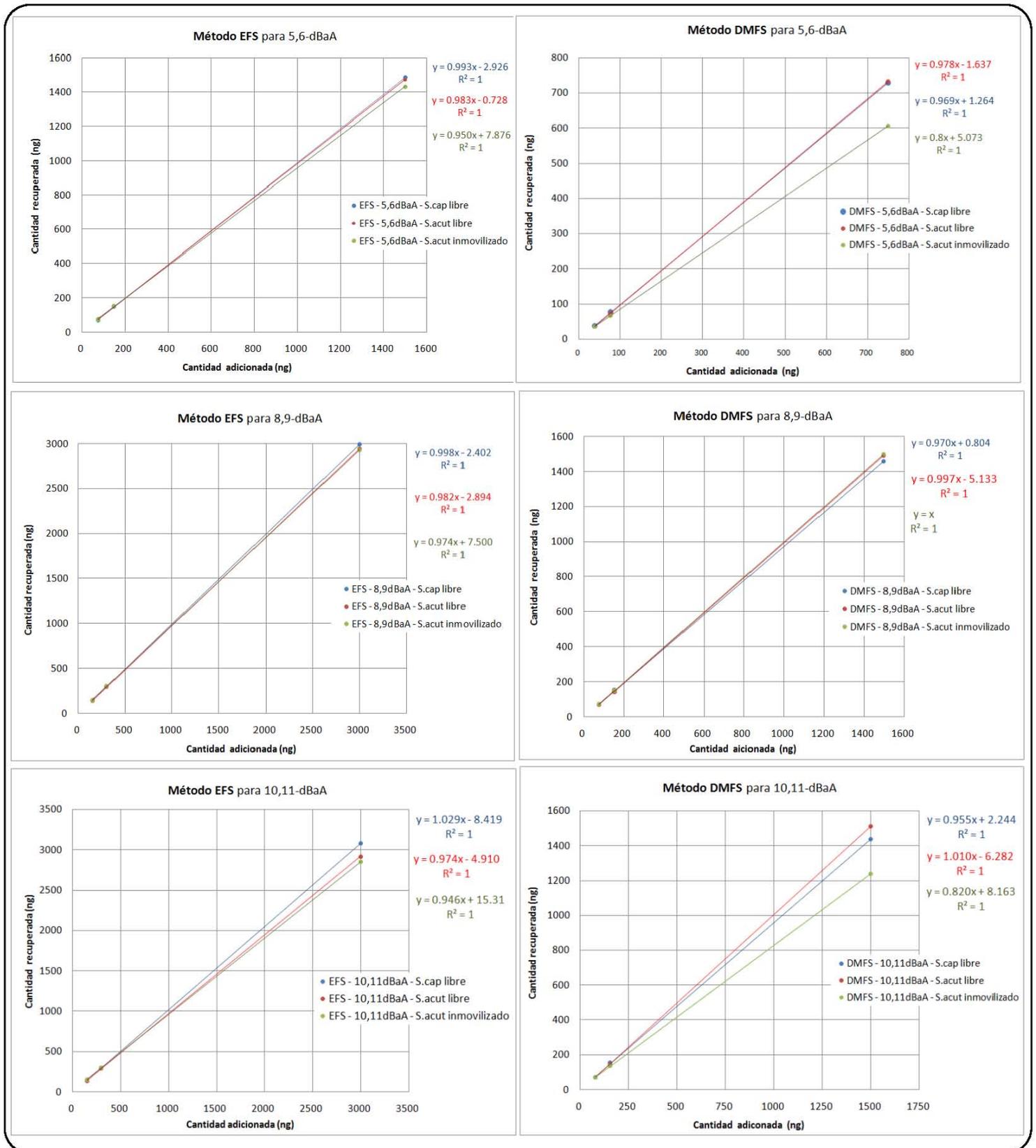


Figura 37. Gráficos de la linealidad del método de EFS y DMFS.

## 7.6 ANOVA para la recuperación de la extracción entre microalgas

Análisis de las cantidades máximas producidas por las microalgas inmovilizadas, *S. capricornutum* y *S. acutus*. En las siguientes tablas se muestran los valores empleados y el cálculo de ANOVA.

**Tabla 24.** Cantidades neta máximas para cada metabolito (medio líquido + biomasa).

# réplica	Metabolito 5,6-dBaA		Metabolito 8,9-dBaA	
	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. acutus</i>	<i>S. capricornutum</i>	<i>S. acutus</i>
1	306.87	324.22	455.11	793.38
2	296.33	327.77	682.27	737.98
3	334.66	362.63	611.46	730.32
Tiempo de bioensayo (h)	12	72	12	48

**Tabla 25.** Salida arrojada por Excel para el ANOVA. Se enmarcan en un cuadro los valores tomados para la discusión de resultados (ver página 63).

### Análisis de varianza de un factor para metabolito 5,6-BaA

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
S.cap	3	937.8605799	312.6201933	392.1703263
S.acut	3	1014.613836	338.2046121	450.5099748

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor calculado	Probabilidad	Valor de tablas
Entre grupos	981.8437276	1	981.8437276	2.330287598	0.201583331	7.708647421
Dentro de los grupos	1685.360602	4	421.3401506			
Total	2667.20433	5				

### Análisis de varianza de un factor para metabolito 8,9-BaA

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
S.cap	3	1748.845794	582.948598	13509.76333
S.acut	3	2261.6765	753.8921667	1183.93109

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor calculado	Probabilidad	Valor de tablas
Entre grupos	43832.5555	1	43832.5555	5.966172189	0.071011025	7.708647421
Dentro de los grupos	29387.38884	4	7346.847209			
Total	73219.94433	5				